

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

METHODEN ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON
PENICILLINASE UND IHRE ANWENDUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Irene Jend - Rossmann geb. Rossmann
aus Tübingen

1971

Referent: Professor Dr. Peter Siegmund

Korreferent: Professor Dr. Franz von Bruchhausen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10.12.1971

Der Verfasser dieses Buches ist ein Schüler von
Herrn Professor Dr. Fritz Schlegel in Berlin
und hat die Vorlesungen von Herrn Dr. Schlegel
mit großer Freude besucht.

Meiner Mutter gewidmet

Es ist mir eine große Freude, dieses Buch
an die Erinnerung an meine Mutter zu widmen,
die mich in der Kindheit und Jugend mit
ihrem Rat und Tadel begleitet hat. Ich
hoffe, dass es ihr gefallen wird, wenn
sie es liest.

Das Buch ist in der Druckerei von
Herrn Dr. Schlegel in Berlin gedruckt.
Es ist in der Buchhandlung von
Herrn Dr. Schlegel in Berlin zu haben.

Das Buch ist in der Druckerei von
Herrn Dr. Schlegel in Berlin gedruckt.
Es ist in der Buchhandlung von
Herrn Dr. Schlegel in Berlin zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Herrn Professor Dr. Peter Siegmund im Zentral-
institut für Biochemie und Biophysik der Freien
Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr. Peter Siegmund gilt mein Dank
für die Überlassung des Themas und die wohlwollen-
de Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Seine
Bereitschaft zu kritischer Diskussion bedeutete eine
große Hilfe zur Überwindung theoretischer und me-
thodischer Probleme.

Herrn Professor Dr. Friedrich Körber möchte ich
für seine stete Hilfsbereitschaft sowie seine wert-
vollen Ratschläge und Anregungen herzlich danken.

Frau Gudrun Welge und Frau Bärbel Vasak danke
ich für technische Assistenz.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A] Allgemeiner Teil

I. Einführung	4
II. Klinische Bedeutung von Penicillinase	5
III. Bisherige Methoden der Penicillinasebestimmung	6
IV. Aufgabenstellung	9

B] Ergebnisse und Diskussion

I. Entwicklung einer photometrischen Bestimmungsmethode	
1. Untersuchung der Mercaptidbildung	11
a) Extinktionsmessung mit konstanter Meßstrahlung der Wellenlänge 250 nm	11
b) Änderung der Absorptionsspektren	11
c) Einfluß der Ionenstärke	15
d) pH - Einfluß	17
2. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten - Konzentrationsbereich der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes	17
3. Untersuchung der enzymatischen Reaktion	20
a) Einfluß der pCMB - Konzentration	20
b) pH - Abhängigkeit	21
c) Spezifische Ioneneinflüsse und Ionenstärke	22
4. Anwendungsbeispiele	
a) Aktivitätsbestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen - Michaeliskonstante	22
b) Bestimmung von Penicillinase im Kaninchenplasma nach i. v. - Injektion	26
c) Bestimmung von Penicillinase im Ultraschallhomogenat von E. coli nach Induktion mit Penicillin	28

	Seite
II. pH - Stat - Methode	
1. Prinzip der Methode	32
2. Wahl des pH - Wertes	32
3. Aktivitätsbestimmung bei hohen Substratkonzentrationen - Einfluß von pCMB	33
4. Messung bei kleinen Substratkonzentrationen	34
III. Vergleich der Methoden	40
<u>C] Zusammenfassung</u>	41
<u>D] Methodischer Teil</u>	
I. Geräte, Reagentien, Lösungen	
1. Geräte	43
2. Reagentien	44
3. Lösungen	45
II. Gehaltsbestimmungen	
1. Gehaltsbestimmung von Natriumbenzylpenicilloat durch photometrische Titration	46
2. Gehaltsbestimmung von Penicillin	
a] durch photometrische Titration	47
b] aus der optischen Drehung	47
III. Photometrische Bestimmungen	
1. Photometrische Bestimmung der Penicillinaseaktivität	
a] in Lösungen des Enzyms und im Kaninchenplasma	48
b] im Ultraschallhomogenat von E.coli	48
2. Untersuchung der Mercaptidbildung aus Natriumbenzylpenicilloat und pCMB	49

	Seite
3. Absorptionsspektren zwischen 290 und 240 nm	50
4. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten - Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes	50
IV. pH - Stat - Bestimmungen	
1. Aktivitätsbestimmung bei hohen Substratkonzentrationen	51
2. Bestimmung der Michaeliskonstanten	52
V. Titration von Natriumbenzylpenicilloat - Bestimmung des pK - Wertes	52
<u>E] Literaturverzeichnis</u>	54
<u>Lebenslauf</u>	63

A] Allgemeiner Teil

I. Einführung

Abraham und Chain [2] entdeckten 1940 ein Enzym, das sie aufgrund seiner Eigenschaft, Penicillin zu inaktivieren, Penicillinase nannten. Es wird von vielen grampositiven und gramnegativen Bakterien gebildet und kommt sowohl als Endo- wie auch als Exoenzym vor. Woodruff und Foster [78] konnten die Bildung von Penicillinase sogar bei Protozoen, Aktinomyceten, Pilzen, Hefen und höheren Organismen nachweisen. In manchen Bakterienstämmen ist das Enzym schon primär vorhanden [= konstitutive Enzymentstehung], in anderen wird es beim Kontakt mit Penicillin, vor allem bei geringer Dosierung, induziert [= induktive Enzymentstehung] [39]. Die Bildung von Penicillinase ist im letzten Fall eine Anpassungsreaktion der Bakterien mit Aufhebung der antibiotischen Wirksamkeit des Penicillins, im ersten Fall die Ursache für die Selektion primär resistenter Keime. Penicillinase ist damit, wie schon früh vermutet wurde [10], die häufigste Ursache der Penicillinresistenz; andere enzymatische Abbaureaktionen, wie die durch die Penicillinacylase katalysierte Hydrolyse der Seitenkette [27], spielen daneben keine wesentliche Rolle [69]. Hand in Hand mit der Penicillintherapie hat deswegen die Penicillinase schon früh starkes Interesse gefunden und war Gegenstand ausgiebiger Untersuchungen.

Benedict u.a. [8] und Foster [25] fanden, daß bei der Reaktion mit Penicillin eine neue Säuregruppe entsteht. Das Reaktionsprodukt wurde aufgrund entsprechenden Verhaltens von verschiedenen Autoren [1, 8, 25] als Penicillossäure identifiziert. Penicillinase katalysiert die Hydrolyse der Peptidbindung im β -Lactamring des Penicillins [Abbildung 1].

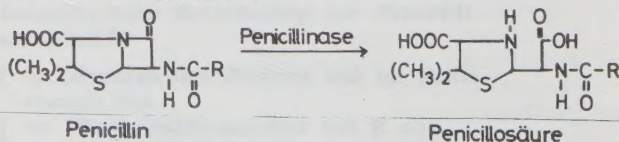


Abb.1: Penicillinasereaktion

Untersuchungen von Banfield [4] ergaben, daß Penicillinasen eine Michaelis-Menten-Kinetik [48] besitzen. pH- und Temperaturoptimum sind je nach der Enzymquelle verschieden. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt etwa 30 000.

II. Klinische Bedeutung von Penicillinase

Klinische Anwendung findet Penicillinase in allen Situationen, in denen Penicillin inaktiviert werden soll. Insbesondere geht durch Überführung in Penicillosäure nicht nur die antibiotische Aktivität verloren, sondern auch die antigene Wirksamkeit des Penicillins [49]. Nach heutiger Ansicht verhält sich Penicillin als Hapten, das Proteine substituiert. Auf verschiedenen Reaktionswegen [65, 66] entstehen dabei Penicilloylderivate, die als polyvalente Vollantigene wirksam werden. Penicillosäure dagegen kann sich nicht direkt mit Protein verbinden. Siegel und Levine [67] glauben zwar, daß manche Patienten positive Reaktionen bei immunologischen Tests zeigen, andere Autoren [5] vertreten jedoch die Ansicht, daß Penicillosäure bei den Vorgängen der Penicillinallergie keine Rolle spielt. Sie scheint sogar vielmehr als monovalenter Inhibitor gegen die für das penicilloylsubstituierte Protein spezifischen Antikörper zu wirken [41].

Becker [6] schlug deshalb als erster vor, in Fällen von allergischen Reaktionen nach therapeutischen Penicillingaben als eine kausale Form der Therapie Penicillinase zu verabreichen, die im Tierversuch intramuskulär gespritzt gut resorbiert wurde und in aktivem Zustand im Blut zirkulierte. Die ersten klinischen Untersuchungen durch Minno und Davis [49], sowie später berichtete Untersuchungen [7, 22, 81] ergaben gute Resultate bei urtikariellen Reaktionen mit Pruritus und Serumkrankheit, den beiden häufigsten Reaktionstypen bei Penicillinallergie. In den seltenen Fällen einer anaphylaktischen Reaktion kann die Wirkung der Penicillinase nicht rasch genug einsetzen, um als alleinige therapeutische Maßnahme in Betracht zu kommen [73]. Trotzdem ist es aber notwendig, neben den herkömmlichen Maßnahmen der Schocktherapie das wirksame Penicillin möglichst rasch aus dem Organis-

mus zu entfernen, um schwerste Spätfolgen zu verhindern. Die Bedeutung dieser Therapiemöglichkeit wird klar, wenn man sich vergegenwärtigt, daß die Häufigkeit allergischer Reaktionen auf Penicillin bereits 1964 von Westermann u. a. [76] mit 10 bis 15 % in mancher Populationen angegeben wurde. Hämagglutinierende Antikörper - die jedoch nicht für allergische Reaktionen verantwortlich sind - konnten bei 97 % aller Patienten nachgewiesen werden, darunter auch vielen, die wesentlich nie mit Penicillin in Berührung gekommen waren. Der Kontakt mit Penicillin ist daher heute als universell anzusehen [70].

Neuerdings wurde auch empfohlen, bei vermuteter Penicillinallergie nach Abschluß der Therapie prophylaktisch Penicillinase zu verabreichen, um das Penicillin möglichst rasch aus der Blutbahn zu entfernen und die Ausbildung von Antikörpern zu unterdrücken [57]. Diese Frage ist jedoch problematisch, da Penicillinase als Protein selbst Antikörperbildung hervorruft und nur bei strenger Indikation verabreicht werden sollte.

Markov [46] deutete außerdem die Möglichkeit an, die Antigeneigenschaften der Penicillinase für die Therapie zu nutzen. Wie schon zuvor Housewright und Henry [32] gewann er ein Immuneserum gegen Penicillinase und konnte mit diesem bei gemeinsamer Verabreichung mit Penicillin eine antibiotische Wirkung gegen sonst resistente *Staphylococcus aureus* - Stämme erzielen. Klinische Erfahrungen stehen jedoch aus.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Penicillinase im klinischen Bereich beziehen sich auf die Entfernung restlichen Penicillins in Blutkulturen zur Verhütung falsch negativer Ergebnisse [31, 29, 21, 14] oder auf Sterilitätstests von biologischen Standardpräparaten, die Penicillin enthalten.

III. Bisherige Methoden der Penicillinasebestimmung

Die ersten quantitativen Penicillinasebestimmungen erfolgten, in Anlehnung an die Penicillinbestimmungsmethoden, auf biologischem Weg. Es wurde in den Jahren 1942 bis 1947 eine Vielfalt von prinzipiell ähnlichen Methoden beschrieben [vgl. 23]. Bei diesen wurde entweder

nach Beendigung der enzymatischen Reaktion und Entfernung der Penicillinase das restliche Penicillin durch die Hemmwirkung auf das Wachstum empfindlicher Testkeime bestimmt [47, 21, 74, 8, 78]; oder es wurden Penicillin und Penicillinase zusammen mit einem Testkeim in flüssigem oder festem Nährmedium inkubiert, und die Enzymmenge bestimmt, die aufgrund der Penicillinspaltung ein eben sichtbares Bakterienwachstum ermöglicht [29, 12, 58, 3]. All diesen Verfahren ist gemeinsam, daß der Parameter des Bakterienwachstums 24 bis 48 Stunden oder mehr Zeit in Anspruch nimmt, um messbare Ergebnisse zu liefern.

Chemische Methoden erlauben es dagegen, die Umwandlung von Penicillin in Penicillosäure direkt zu messen. Ausgehend von der Beobachtung Fosters [25], daß bei der Spaltung von Penicillin durch Penicillinase in Gegenwart von Bicarbonat CO_2 freigesetzt wird, beschrieben Henry und Housewright 1947 eine manometrische Bestimmungsmethode. Sie ist jedoch sehr umständlich und für die Bestimmung der sehr kleinen Michaeliskonstanten von Penicillinasen nicht empfindlich genug. Die geringste Substratkonzentration, bei der Henry und Housewright noch messen konnten, lag bei etwa $80 \mu\text{M}$.

Ein alkalimetrisches Verfahren wurde zuerst von Murtaugh und Levy [51], später von Wise und Twigg [77] angegeben. In der ursprünglichen Form, nämlich Konstanthalten des pH durch Titration aus einer Bürette, ist es nicht nur umständlich durchzuführen, sondern auch sehr unempfindlich. [vgl. 17]. Sabath u.a. [63] benutzten für die Titration ein pH-Stat-Gerät und konnten gute Ergebnisse bis zu einer minimalen Substratkonzentration von $70 \mu\text{M}$ erzielen, was jedoch für die Bestimmung von Michaeliskonstanten ebenfalls zu unempfindlich ist.

Perret [53] berichtete 1954 über eine jodometrische Methode. Sie basiert auf der Tatsache, daß Jod durch Penicillosäure reduziert wird, aber nicht durch Penicillin. Diese Reaktion verläuft jedoch nicht streng stöchiometrisch [26]; ein Molekül Benzylpenicillosäure reagiert je nach Bedingungen mit 8 bis 9 Atomen Jod. Nach Abschluß der enzymatischen Reaktion wird die Reaktionslösung mit einem gemessenen Überschuß von Jodlösung versetzt und nach weiterem Inkubieren mit Natriumthio-

sulfat zurücktitriert. Citry [16] modifizierte die Methode zu einer chromometrischen, wobei die Zeit bis zum Eintritt der Entfärbung einer zugesetzten Jod-Stärke-Lösung der Enzymaktivität umgekehrt proportional ist. Im Gegensatz zu manometrischen und alkalimetrischen Verfahren ist diese Methode über weite pH-Bereiche anwendbar. Häufig ist jedoch Penicillin durch reduzierende Substanzen verunreinigt, was zu falschen Ergebnissen führt. Zu beachten ist außerdem, daß Penicillinase in verschiedenen Formen vorkommt, nämlich als Endo- und Exoenzym, die sich, wie Citry für *Bacillus cereus*-Penicillinase nachwies [16], in ihrer Hemmbarkeit durch Jod unterscheiden lassen: während in diesem Fall die α -Form [= Exoenzym] durch Jod nicht beeinflusst wurde, wurde die zellgebundene γ -Form durch Jod rasch inaktiviert [vgl. auch 55]. Es ist bemerkenswert, daß beide Formen ineinander übergehen können [16], was wahrscheinlich durch Strukturänderungen im Molekül, wie z.B. die Spaltung von Wasserstoffbrücken, zu erklären ist.

Von allen bisher erwähnten Methoden war nur die umständlichste und zeitraubendste, nämlich die biologische, für die Messung bei so geringen Substratkonzentrationen, wie sie für die Bestimmung der Michaeliskonstanten nötig ist, empfindlich genug. [55]. Doch auch sie erlaubte nicht die Messung der Anfangsgeschwindigkeit, denn bei der Bestimmung muß wenigstens ein Viertel der anfänglichen Substratmenge umgesetzt sein, wenn das Ergebnis zuverlässig sein soll.

All diese Schwierigkeiten schien Novick [52] mit seiner mikrojdometrischen Bestimmungsmethode beseitigt zu haben. Der Reaktionsverlauf wird dabei anhand der Entfärbung von Jod-Stärke-Komplex photometrisch verfolgt. Dies ermöglicht die Messung der Anfangsgeschwindigkeit und damit die Aktivitätsbestimmung auch bei kleinen Substratkonzentrationen. Tatsächlich ist diese Methode äußerst empfindlich und erlaubt Messungen bis zu Substratkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$. Es besteht jedoch eine auffällige Diskrepanz der Ergebnisse im Vergleich mit anderen Methoden: es werden um 40 % geringere Aktivitäten gemessen. Wenn auch Novick meint, daß Penicillinase von Staphylokokken durch Jod nicht beeinflusst werde, wäre dennoch die Hemmung durch Jod eine mögliche Erklärung, vor allem da dieses Enzym im

Gegensatz zu den meisten Präparaten anderer Herkunft hauptsächlich in der zellgebundenen Form vorliegt [71]. Für *Bacillus cereus* - Penicillinase haben Pollock [55] und Citry [16] gefunden, daß besonders das Endoenzym sich durch hohe Hemmbarkeit durch Jod auszeichnet. Eine Beeinflussung durch Jod sollte schon aufgrund des Tyrosingehaltes der Penicillinasen [vgl. 3] vermutet werden, da Jod mit Tyrosinresten reagiert.

Außer den hier erwähnten gibt es noch eine Reihe anderer Bestimmungsmethoden, die keine nennenswerten Vorteile aufweisen.

IV. Aufgabenstellung

p - Chlormercuribenzoat [pCMB] wurde von Boyer [11] zur photometrischen SH - Gruppenbestimmung eingeführt. Es wird dabei ein Mercaptid gebildet, das bei 250 nm eine beträchtliche Extinktionszunahme verursacht. Weiter konnte gezeigt werden daß Thiazolidine mit pCMB entsprechend reagieren [68]. Benzylpenicillin reagiert dagegen trotz seines Thiazolidinringes nur außerordentlich langsam mit pCMB [38]. Wird jedoch der angegliederte Lactamring gespalten, so reagiert die gebildete Penicillosäure rasch mit dem pCMB. Woodward u.a. [79] konnten zeigen, daß die Reaktion von Penicillosäure mit HgCl_2 über ein Zwischenprodukt verläuft, das sie Penamaldat nannten, und das durch eine hohe Lichtabsorption bei 280 nm charakterisiert ist. Unter Hydrolyse und Decarboxylierung reagiert es - je nach Versuchsbedingungen mehr oder weniger rasch - weiter zum Mercaptid des Penicillamins. Ein entsprechender Reaktionsverlauf kann bei der Reaktion mit pCMB angenommen werden, insbesondere da nachgewiesen werden konnte, daß ein Zwischenprodukt mit hoher Lichtabsorption bei 280 nm entsteht [68]. [Abb. 2].

Es war zu prüfen, ob diese Reaktionsfolge zur Messung der Penicillinaseaktivität [vgl. 62] benutzt wer-

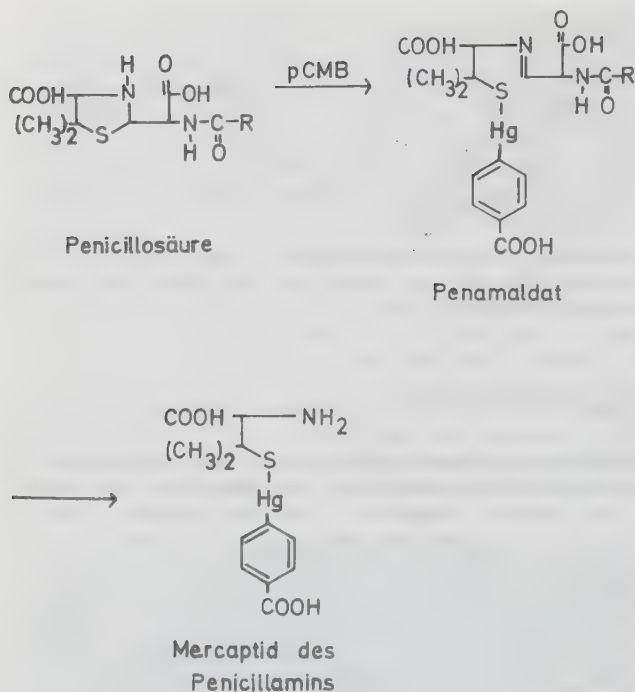


Abb. 2: Mercaptidbildung aus Penicillosäure und pCMB

den kann. Hierzu müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die enzymatische Spaltung muß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein,
2. pCMB darf unter den Meßbedingungen das Enzym nicht hemmen,
3. die durch die Mercaptidbildung hervorgerufene Extinktionsänderung bei 250 nm muß dem Lambert-Beer-schen Gesetz folgen.

B] Ergebnisse und Diskussion

I. Entwicklung einer photometrischen Bestimmungsmethode

1. Untersuchung der Mercaptidbildung

Die Kinetik der Mercaptidbildung, d.h. der Reaktion von Penicillosäure mit pCMB, interessierte uns vor allem im Zusammenhang mit der Frage, unter welchen Bedingungen die enzymatische Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Wir untersuchten daher den zeitlichen Verlauf der Extinktionsänderung bei der Reaktion reiner Benzylpenicillosäure mit pCMB.

a] Extinktionsmessung mit konstanter Meßstrahlung der Wellenlänge 250 nm

Die Versuchsbedingungen der photometrischen und der alkalimetrischen Methode mußten so gewählt werden, daß sie einen Vergleich der Methoden erlaubten. Wir veränderten daher verschiedene Parameter und fanden dabei, daß bei photometrischen Bestimmungen in Phosphatpuffer geringerer Konzentration die Reaktion nicht wie erwartet verlief. Wir verfolgten daraufhin den Reaktionsverlauf bei drei verschiedenen Pufferkonzentrationen [0,1 M, 0,01 M, 0,001 M Phosphatpuffer pH 6,8], indem wir den zeitlichen Verlauf der Extinktionsänderung, gemessen gegen eine Lösung gleicher pCMB-Konzentration, aufzeichneten. In 0,001 M und 0,01 M Pufferlösung tritt zunächst ein stärkerer Extinktionsanstieg auf, die Extinktion sinkt aber innerhalb der ersten Minuten wieder ab, um dann im Verlauf von mehreren Minuten langsam einem Endwert zuzustreben. Wird die Reaktion jedoch in 0,1 M Phosphatpuffer durchgeführt, so wird bereits nach einer Minute ein konstanter Endwert erreicht. [Abb.3].

b] Änderung der Absorptionsspektren

Um zu prüfen, welcher Schritt der Reaktionsfolge dieses Phänomen verursacht, untersuchten wir mit dem registrierenden Spektralphotometer die zeitliche Verän-

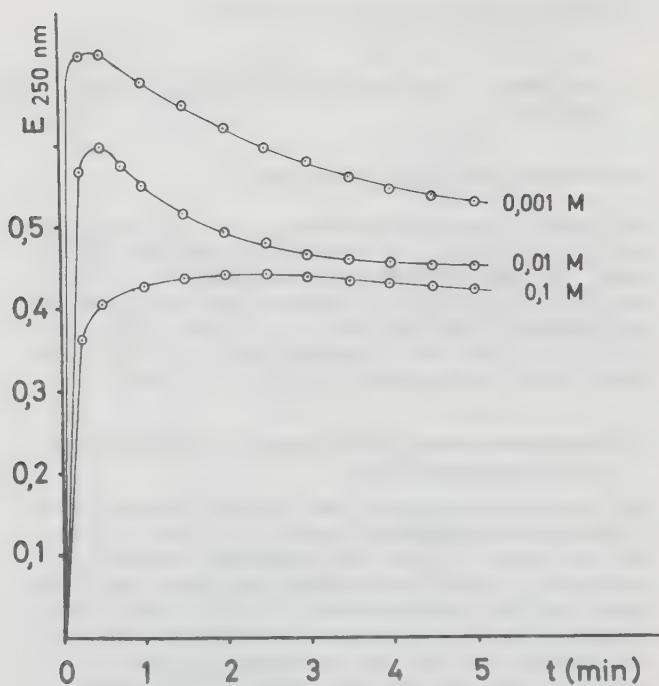
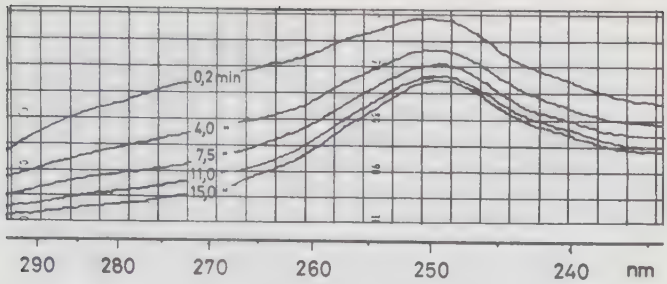
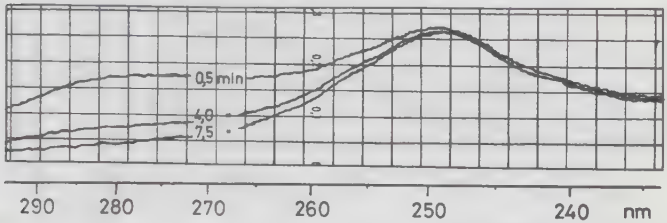


Abb. 3:

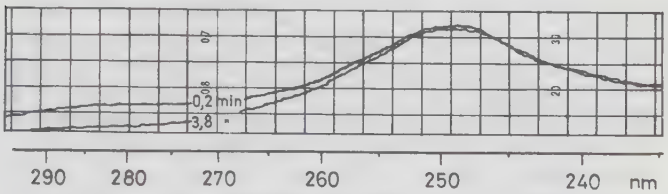
Extinktionsverlauf bei der Mercaptidbildung aus pCMB und Benzylpenicillosäure bei verschiedenen Phosphatpufferkonzentrationen



a: 0,001 M Phosphatpuffer pH 6,8 ($J=0,002$)



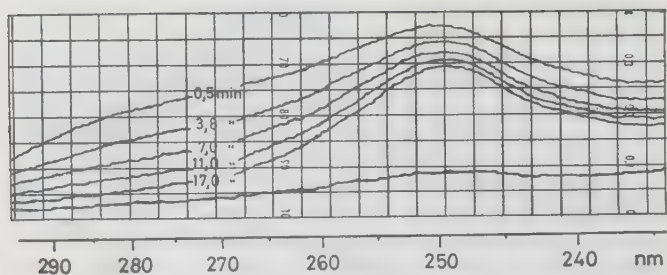
b: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 ($J=0,2$)



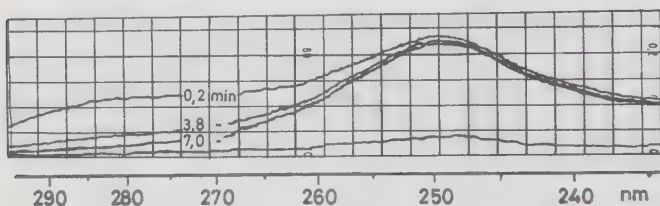
c: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 ($J=0,2$)

Abb. 4:

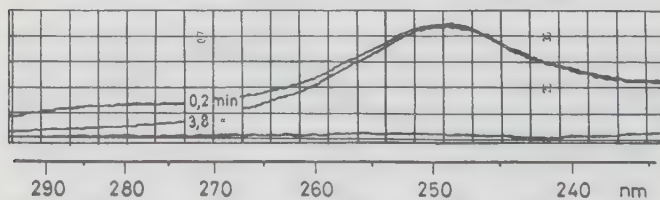
Änderung der Absorptionsspektren bei der Spaltung von Benzylpenicillosole mit pCMB in unterschiedlichen Phosphatpufferlösungen. Die Spektren wurden sofort nach Start der Reaktion und dann nach den in den Kurven angegebenen Zeiten geschrieben.



a: 0,001 M Phosphatpuffer pH 6,8 ($J=0,002$)



b: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 ($J=0,2$)



c: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 ($J=0,2$)

Abb. 5:

Änderung der Absorptionsspektren bei der Spaltung von Penicillin durch Penicillinase in Gegenwart von pCMB in unterschiedlichen Phosphatpufferlösungen. Die Spektren wurden sofort nach Start der Reaktion und dann nach den in den Kurven angegebenen Zeiten geschrieben. Die untersten nicht beschrifteten Kurven sind die Differenzspektren des Reaktionsgemisches gegen pCMB-Lösung vor Zusatz von Penicillinase.

derung der Spektren im Bereich von 240 bis 290 nm bei den entsprechenden Reaktionsbedingungen, und zwar wählten wir zum Vergleich 0,001 M und 0,1 M Phosphatpuffer. Durch Aufzeichnung der Spektren über 15 Minuten erhielten wir eine Schar von Kurven, die erste jeweils sofort nach Start der Reaktion, die folgenden zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten [Abb. 4]. In 0,001 M Phosphatpuffer sind während der ersten 11 Minuten erhebliche Änderungen der Lichtabsorption über den ganzen Wellenlängenbereich festzustellen. Da die Änderung bei 250 nm, unserer bevorzugten Meßstrahlung, bei der durch die Bildung des Mercaptids die größte Extinktionsänderung hervorgerufen wird, etwa der Änderung bei 280 nm, wo das Penamaldat nach Woodward [79] ein Absorptionsmaximum besitzt, entspricht, ist anzunehmen, dass diese Änderungen auf die langsame Zersetzung des unter diesen Reaktionsbedingungen relativ stabilen Penamaldats zurückzuführen sind.

Identische Spektren erhielten wir, wenn wir unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen anstelle von Benzylpenicillosäure Penicillin in Gegenwart von Penicillinase einsetzten. [Abb. 5]

c] Einfluß der Ionenstärke

Wir prüften, ob der raschere Reaktionsverlauf bei Verwendung von 0,1 M Pufferlösung auf der höheren Ionenstärke beruht. Durch Zusatz von Natriumsulfat oder Kaliumperchlorat bis zur Ionenstärke $I = 0,2$ [das entspricht der Ionenstärke von 0,1 M Phosphatpuffer] zur 0,001 M Pufferlösung erhielten wir den gleichen zeitlichen Verlauf der Spektren wie in 0,1 M Phosphatpuffer. Bei Verfolgung der Reaktion bei konstanter Meßstrahlung 250 nm fanden wir, daß die Erhöhung der Ionenstärke auf $I = 0,4$ durch die genannten Zusätze zu 0,1 M Phosphatpuffer das Konstantwerden der Extinktion noch etwas früher eintreten lässt. Die Wirkung ist von der Art der Ionen unabhängig und wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß die Stabilität des Penamaldats vermindert und damit die Umsetzung zum Mercaptid beschleunigt wird. [Abb. 6].

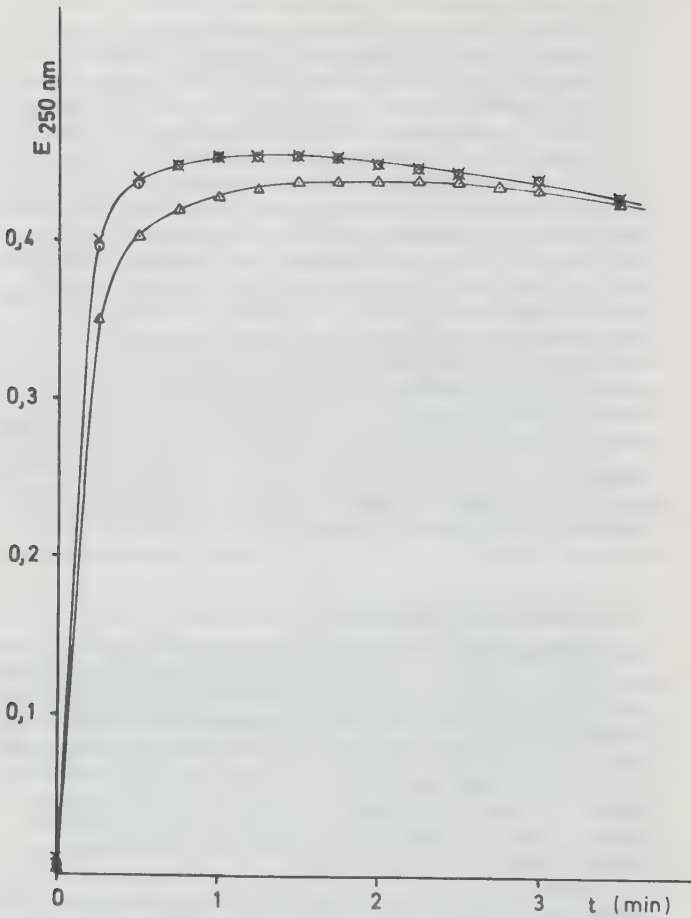


Abb. 6:

Extinktionsverlauf bei der Mercaptidbildung aus Benzylpenicillosäure und pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 ohne Zusatz [Δ , $I=0,2$] und nach Zugabe von 1 mMol Na_2SO_4 [$\circ$, $I=0,4$] bzw. 2 mMol KClO_4 [$\times$, $I=0,4$] zu 10 ml Ansatz.

d] pH - Einfluß

Im pCMB wird das Cl bei höherem pH-Wert durch Hydroxylgruppen ersetzt. Löslichkeit und Reaktionsfähigkeit sind daher vom pH der Lösung abhängig [9]. Für die meisten quantitativen SH-Gruppenbestimmungen, wie z.B. die mit Cystein durchgeführte photometrische Titration [38] ist ein pH-Wert der Reaktionslösung von 4,6 optimal, da hier das Lambert-Beer'sche Gesetz in einem größeren Bereich erfüllt ist. Dieser pH-Wert der Reaktionslösung weicht aber zu sehr vom pH-Optimum des Enzyms ab, sodaß er hier nicht angewandt werden kann.

Bei der Aufzeichnung der Absorptionsspektren konnten wir bei 250 nm keinen Unterschied bei Verwendung von 0,1M Phosphatpuffer pH 6,8 und 0,1M Phosphatpuffer pH 6,0 feststellen [Abb. 4 b und c]. Beide Spektren lassen erkennen, daß bei dieser Wellenlänge bereits beim ersten Durchgang [etwa nach 2 Minuten] ein Extinktionsendwert erreicht wird, der sich im weiteren Verlauf nur unwesentlich ändert. Wir untersuchten dann bei konstanter Meßstrahlung 250 nm die Kinetik des Extinktionsanstiegs bei der Reaktion von pCMB mit Penicillosäure in 0,1M Pufferlösungen [$I = 0,2$] von pH 6,0, 6,4 und 6,8 [dem Bereich des pH-Optimums von Penicillinase] [Abb. 7]. Die drei Kurven zeigen ähnlich Verläufe, es hat sogar den Anschein, daß bei pH 6,8 der Endwert der Extinktionszunahme noch etwas rascher erreicht wird, sodaß auf jeden Fall bei diesem pH-Wert die Aktivitätsbestimmung exakt durchzuführen ist.

2. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten - Konzentrationsbereich der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes

Bei der Reaktion von Penicillosäure mit pCMB entsteht das die Extinktion bei 250 nm erhöhende Mercaptid. Gleichzeitig verringern sich aber die Konzentrationen von Penicillosäure und pCMB. Die Lichtabsorption von Penicillosäure bei 250 nm ist gering und liegt bei den angewandten Konzentrationen innerhalb der Fehlerbreite. pCMB absorbiert jedoch bei dieser Wellenlänge sehr stark, deshalb erfolgten alle Absorptionsmessungen gegen eine pCMB-Lösung gleicher Konzentration. Die gemessenen Extinktionsänderungen sind da-

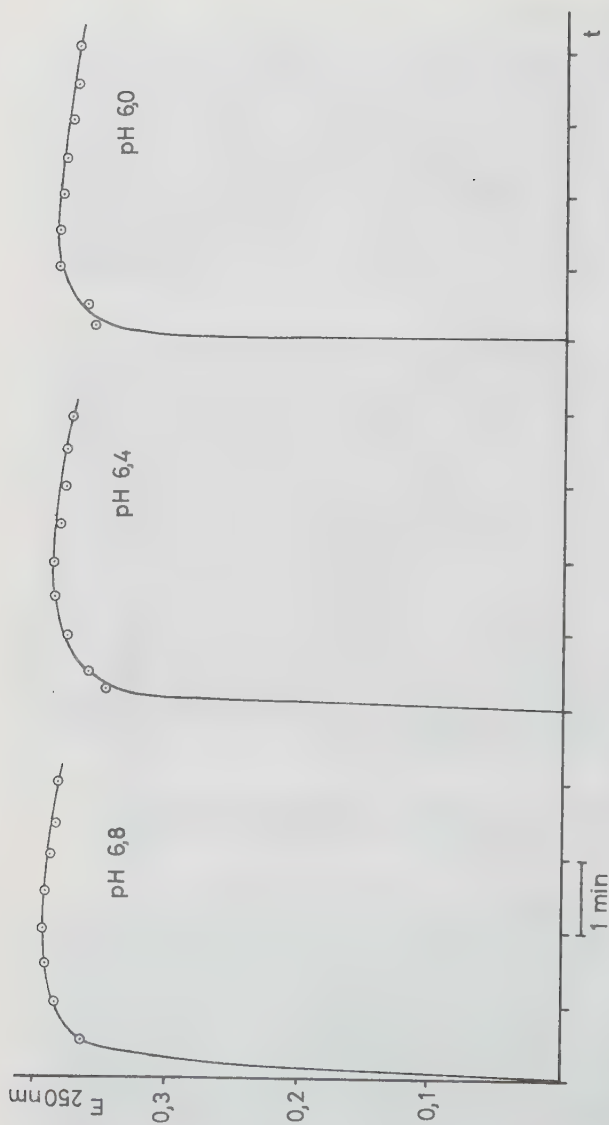


Abb. 7: Extinktionsverlauf bei der Mercaptidbildung aus Benzylpenicillosäure und pCMB in 0,1M Phosphatpufferlösungen verschiedener pH - Werte.

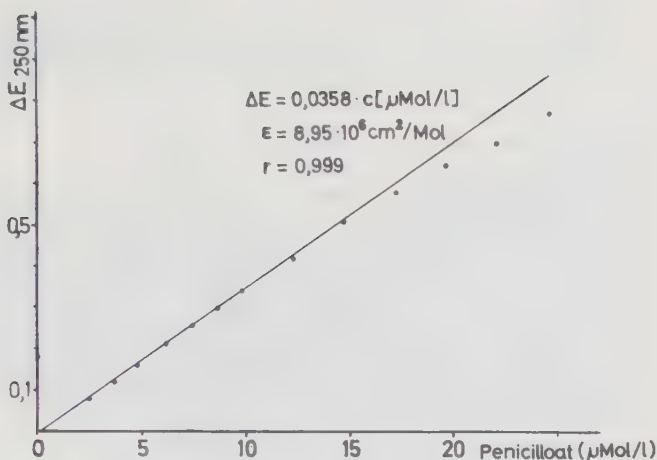


Abb. 8:

Gültigkeit des Lambert - Beerschen Gesetzes bei 250 nm für die Bildung des Mercaptids aus Benzylpenicillosäure und pCMB [0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,8 , I=0,2].

her die Resultierenden aus mehreren Einzelkomponenten. Wir prüften nun, ob die auftretende Extinktionserhöhung bei 250 nm der zugefügten Menge Penicillosäure proportional ist.

Wir fügten zu einer pCMB - Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer steigende Mengen an Natriumbenzylpenicilloat und trugen die gemessene Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der pro ml zugesetzten Penicilloatmenge auf [Abb.8]. Bis zu Extinktionsänderungen von 0,4, die einem Zusatz von 0,01 μMol Penicilloat pro ml Ansatz entsprachen, liegen die Meßwerte auf einer Geraden, deren Korrelationskoeffizient 0,999 beträgt. Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte nach der Gleichung $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ als Steigung der Geraden geteilt durch 4 [$d = 4 \text{ cm}$]; wir ermittelten einen Wert von $8,95 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Innerhalb der Fehlergrenze erhält man denselben Wert, wenn man anstelle von Penicillosäure Penicillin in Ge-

genwart von Penicillinase einsetzt. Da jedoch Penicillinsäure-Natriumsalz in höherer Reinheit hergestellt werden kann als Penicillin, erschien es uns für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten geeigneter.

3. Untersuchung der enzymatischen Reaktion

Das Grundverfahren bei der photometrischen Enzymbestimmung war folgendes: 10 ml einer 25 μM [50 μM oder 75 μM] pCMB - Lösung in Phosphatpuffer wurden in eine 4 cm Quarzküvette pipettiert und dieselbe Lösung in die Vergleichsküvette gegeben. Penicillinlösung wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn in die Meßküvette zugegeben und die Extinktion abgelesen. Nach Start der Reaktion mit Penicillinaselösung wurde im Abstand von 15 Sekunden die Extinktionszunahme gemessen.

a] Einfluß der pCMB - Konzentration

Es mußte geprüft werden, ob pCMB in der angewandten Konzentration die Penicillinaseaktivität beeinflusst. Nach Pollock [56] und Yamagashi [80] war dies nicht zu erwarten, Pollock konnte eine 15 %ige Hemmung erst bei einer Konzentration von 2,7 mM feststellen, während unsere Aktivitätsmessungen bei einer pCMB - Konzentration von 25 μM erfolgten. Trotzdem überprüften wir diese Frage photometrisch und alkalimetrisch [s.u.].

Bei Aktivitätsmessung in Lösungen steigender pCMB - Konzentration wurden identische Zeit - Extinktionskurven bei 50 und 75 μM pCMB beobachtet [Abb.9], während bei der kleinsten angewandten Konzentration von 25 μM diese Kurve sich nur während der ersten 4 Minuten mit den obigen deckt, und dann zunehmend flacher verläuft. Dieser Effekt beruht jedoch nicht auf einer Enzymhemmung, sondern auf dem weitgehenden Verbrauch des Mercuribenzoats durch die bei der enzymatischen Reaktion entstehende Penicillosäure. Die pCMB - Konzentration ist dann so klein geworden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Mercaptidbildung nicht mehr ausreicht.

Für unsere Messungen genügt jedoch ein nahezu geradliniger Verlauf während der ersten 4 Minuten, Messungen über längere Zeit sind nicht notwendig. Insbesondere

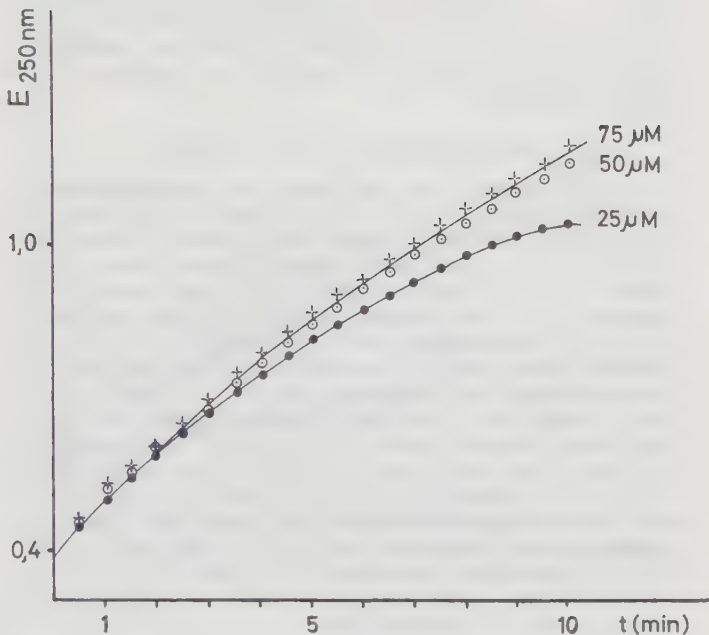


Abb. 9:

Aktivität von Penicillinase bei verschiedenen pCMB - Konzentrationen. [0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,8]

re wäre eine höhere pCMB - Konzentration wegen der erheblichen Eigenextinktion des Mercuribenzoats unvorteilhaft, da dann eine durch größere Spaltbreite bedingte Verringerung der Monochromasie die Meßgenauigkeit beeinträchtigen könnte.

b] pH - Abhängigkeit

Die Angaben über das pH - Optimum von Penicillinase aus *Bacillus cereus* schwanken. Während vor allem in der älteren Literatur pH - Werte von etwa 7,0 angegeben werden [1, 23, 30, 47], werden neuerdings vielfach geringere Werte angegeben [53, 55, 82]. Da es uns um einen Ver-

gleich der photometrischen und alkalimetrischen Methode ging, arbeiteten wir bei einem pH-Wert von 6,8, der als Mindestwert bei der alkalimetrischen Methode erforderlich ist und auch im Bereich der optimalen Enzymaktivität liegt.

c] Spezifische Ioneneinflüsse und Ionenstärke

Da die Ionenstärke die Geschwindigkeit der Mercaptidbildung beeinflusst [s.o.], war zu klären, wie die enzymatische Reaktion in Lösungen verschiedener Ionenstärke abläuft. Wir verfolgten die Penicillinasereaktion zunächst in 0,1 M Phosphatpuffer, der eine rasche Folgereaktion der Penicillosäure mit dem pCMB gewährleistet. Dann wiederholten wir den Versuch mit 0,01 M Phosphatpuffer, dessen Ionenstärke durch Zusatz von Natriumsulfat auf die Ionenstärke des 0,1 M Puffers gebracht wurde. Wir erhielten in dieser Lösung die gleichen Zeit-Umsatz-Kurven wie in 0,1 M Phosphatpuffer. Ein Zusatz von Natriumsulfat zu dem 0,1 M Puffer bis zur Ionenstärke $I=0,4$ verursachte keine weitere Änderung im Verlauf der Extinktionszunahme. Bei entsprechenden Versuchen mit Perchloratzusatz wurden erheblich geringere Enzymaktivitäten gemessen, wobei die Kurven in 0,01 M und 0,1 M Puffer fast gleich verliefen. [Abb.10]. Daraus folgt:

1. Die Ionenstärke hat im Bereich von $I=0,2$ bis $I=0,4$ keinen Einfluß auf die Penicillinaseaktivität.
2. Natrium- und Sulfationen beeinflussen das Enzym im untersuchten Konzentrationsbereich nicht.
3. Perchlorationen hemmen Penicillinase.
4. Obwohl die Mercaptidbildung bei $I=0,4$ noch rascher erfolgt, ist eine Ionenstärke von $I=0,2$ für die Aktivitätsbestimmung ausreichend, da bereits hier bei den beschriebenen Versuchsbedingungen die enzymatische Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

4. Anwendungsbeispiele

- ##### a] Aktivitätsbestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen - Michaeliskonstante

Unter Berücksichtigung dieser Befunde bestimmten wir die Penicillinaseaktivität bei Substratkonzentrationen

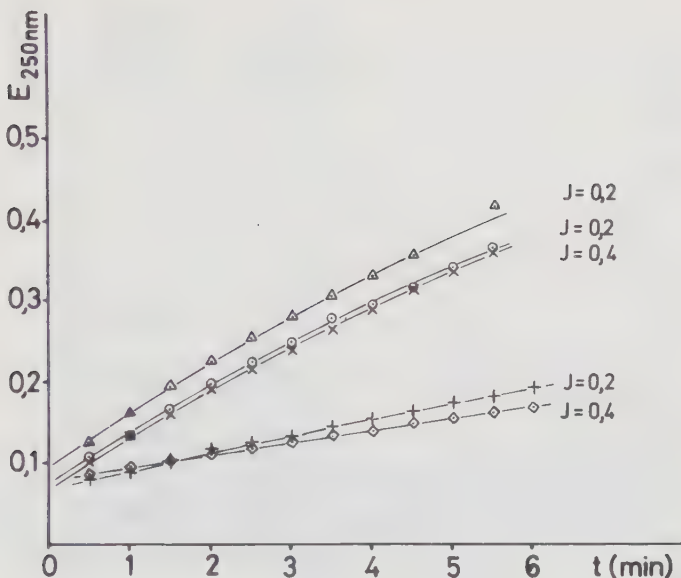


Abb. 10:

Aktivität von Penicillinase bei den Ionenstärken 0,2 und 0,4. Diese Ionenstärken wurden durch verschiedene Pufferkonzentrationen und Salzzusätze erzeugt:

- Δ = 0,01 M Phosphat + Na_2SO_4
- $\circ$ = 0,1 M Phosphat
- $\times$ = 0,1 M Phosphat + Na_2SO_4
- $+$ = 0,01 M Phosphat + NaClO_4
- $\diamond$ = 0,1 M Phosphat + NaClO_4

zwischen 200 und 20 μM . Die Extinktionen wurden im Abstand von 15 Sekunden abgelesen und aus den Meßpunkten der ersten Minuten die Extinktionsänderung pro Minute bestimmt. Anhand des molaren Extinktionskoeffizienten konnte daraus die Reaktionsgeschwindigkeit in μMol pro Minute berechnet werden. [Abb.11] [Tab.1] Die Reziprokwerte wurden gegen die reziproke Substratkonzentration nach Lineweaver - Burk [43] aufgetragen

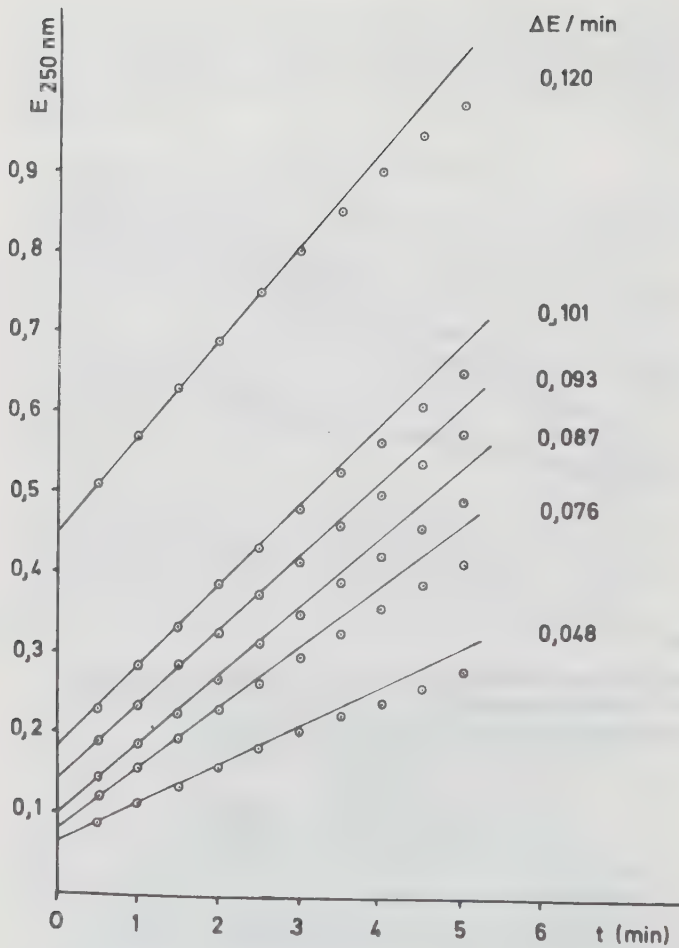


Abb. 11 :

Aktivität von Penicillinase [Extinktionserhöhung durch Mercaptidbildung] bei verschiedenen Substratkonzentrationen. [vgl. auch Abb. 12].

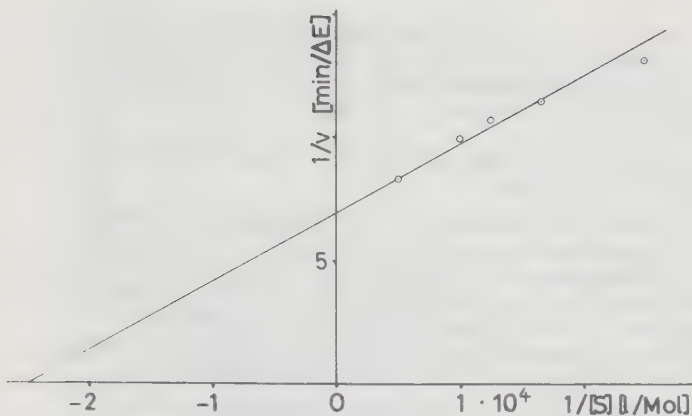


Abb. 12 :

Lineweaver - Burk - Diagramm aus den photometrischen Aktivitätsbestimmungen von Abb.11. Michaeliskonstante: $40 \mu\text{M}$
 Regressionsgerade: $1/v [\text{min}/\Delta E] = 2,71 \cdot 10^4 \cdot 1/[S] [1/\text{Mol}] + 7,01$
 Korrelationskoeffizient: 0,997.

[S] [$\mu\text{Mol/l}$]	$\Delta E/\text{min}$	$\mu\text{Mol/min}$	$\text{min}/\Delta E$	$1/[S] [1/\text{Mol}]$
200	0,120	0,031	8,33	$0,5 \cdot 10^4$
100	0,101	0,026	9,90	$1,0 \cdot 10^4$
80	0,093	0,024	10,75	$1,25 \cdot 10^4$
60	0,087	0,023	11,49	$1,66 \cdot 10^4$
40	0,076	0,019	13,16	$2,5 \cdot 10^4$
20	0,048	0,012	20,83	$5,0 \cdot 10^4$

Tab. 1:

Ergebnisse der photometrischen Aktivitätsbestimmung von Penicillinase.

[Abb.12]. Die nur geringe Streuung der Meßpunkte von der Geraden zeigt die Leistungsfähigkeit der Methode: der Korrelationskoeffizient beträgt 0,997. Für die Michaeliskonstante ermittelten wir einen Wert von 40 μ M.

b] Bestimmung von Penicillinase im Kaninchenplasma nach i.v.-Injektion

Wir benutzten die Methode, um die Verweildauer von Penicillinase im Blut nach i.v.-Injektion zu verfolgen. Für die therapeutische Anwendung von Penicillinase ist es interessant zu wissen, ob die Dauer der Penicillinaseaktivität im Blut lange genug anhält, damit das aus den Zellen diffundierende Penicillin noch gespalten wird, vor allem wenn es sich um Depot-Penicilline handelt.

Wir injizierten einem 4,8 kg schweren Kaninchen 57 U [s.S.44] Penicillinase i.v., das entspricht der therapeutischen Dosis von etwa 12 U pro kg Körpergewicht. Sofort und jeweils nach etwa 10 Minuten wurde eine Blutprobe entnommen, und in dem erhaltenen Plasma die Penicillinaseaktivität bestimmt. Abb. 13 zeigt, daß die Penicillinaseaktivität im Plasma während 40 Minuten auf sehr geringe Werte absinkt. Das steht im Einklang mit dem kleinen Molekulargewicht von 30 000 [19] und der Annahme, daß das Enzym deshalb rasch die Blutbahn verlässt.

Es bleibt dabei unbeantwortet, wie die in der Literatur oft erwähnte außerordentlich lange Wirksamkeit der Penicillinasen im tierischen wie auch im menschlichen Organismus zu erklären ist. Becker hatte 1956 gefunden [6], daß konstante Gaben eines Depot-Penicillins bis zu 4 - 7 Tagen nach einer einmaligen Penicillinaseinjektion von 100 000 bis 800 000 Einheiten nach Levy [42] sehr rasch abgebaut werden, sodaß sie im Blut nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Chen u.a. [15] fanden 1958 beim Kaninchen eine Wirksamkeit bis zu 4 Tagen.

Unsere Befunde scheinen zunächst mit einer derartig langen Wirkdauer nicht übereinzustimmen. Durch reine Verteilung im Extrazellulärraum ist der starke Aktivitätsverlust im Plasma nicht zu erklären. Das geringe Molekulargewicht von 30 000 würde den Schluß nahelegen, daß zumindest ein Teil des Enzyms durch die Nie-

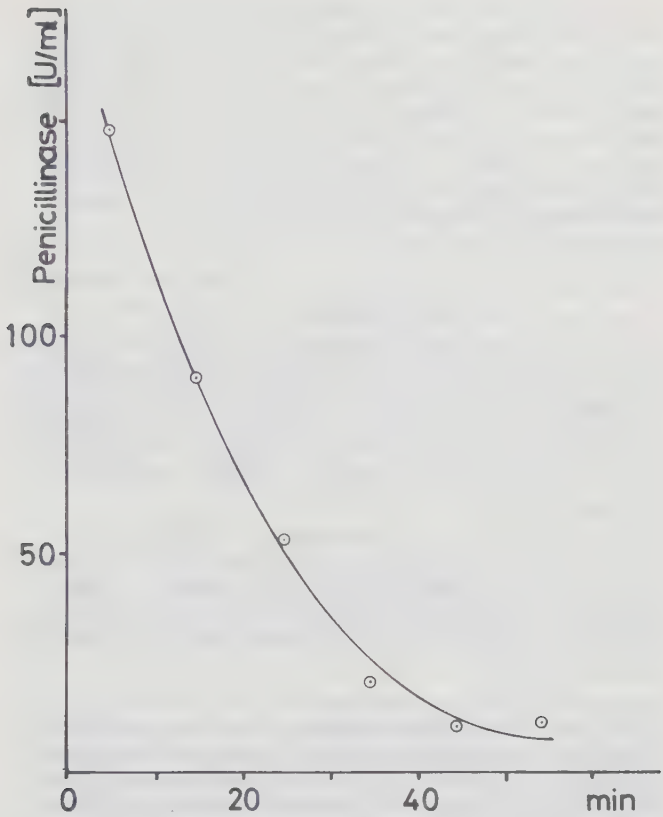


Abb. 13:

Penicillinasekonzentration im Plasma eines Kaninchens [4,8 kg] nach i.v.-Injektion von 57 U [s.S.44] gereinigter Penicillinase aus *Bacillus cereus* [Neutrapen].

re ausgeschieden wird. Bei solch rascher Ausscheidung oder Inaktivierung durch Abbau wäre aber eine Wirkdauer von mehreren Tagen kaum denkbar. Es wäre eventuell angebracht, die 1956 und 1958 erhaltenen Befunde, die mit indirekten Methoden, nämlich Penicillinbestimmungen im Blut, erhalten wurden, nochmals mithilfe einer direkten Enzymbestimmung für Penicillinase zu überprüfen. Es wäre auch denkbar, daß bei der Inaktivierung von Penicillin in vivo noch andere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

c] Bestimmung von Penicillinase im Ultraschallhomogenat von *E. coli* nach Induktion mit Penicillin

Penicillinase ist induzierbar [21, 28, 30, 33, 40, 72] in vielen primär penicillinempfindlichen Bakterienstämmen. Es genügen schon sehr kleine Mengen Penicillin, um die Produktion anzuregen [54]. Dabei ist bis zu einem maximalen Effekt die Menge der gebildeten Penicillinase proportional der Penicillinmenge, die der Bakterienkultur zugesetzt wurde.

Drei Proben und ein Kontrollansatz von *E. coli* B 163 wurden in einem Nährmedium [45] bei 37°C und einer Atmosphäre von 95 % O₂ / 5 % CO₂ inkubiert. Das Wachstum wurde durch Extinktionsmessung bei 405 nm verfolgt und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen [Abb. 14]

Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden den Proben verschiedene Mengen Penicillin zugesetzt, sodaß die Konzentration jeweils 0,1, 1 und 10 µg pro ml betrug. Die Züchtung erfolgte über mehrere Tage, wobei täglich jeweils ein Teil der Ansätze vom Vortag mit neuem Nährmedium aufgenommen und der entsprechenden Menge Penicillin versetzt wurde. Am fünften Tag konnten im Ultraschallhomogenat erhebliche Penicillinaseaktivitäten nachgewiesen werden [Abb. 15]. Wir bestimmten die Aktivität in den verschiedenen Ansätzen, bezogen auf die Proteinkonzentration, die wir nach Lowry bestimmten [44]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

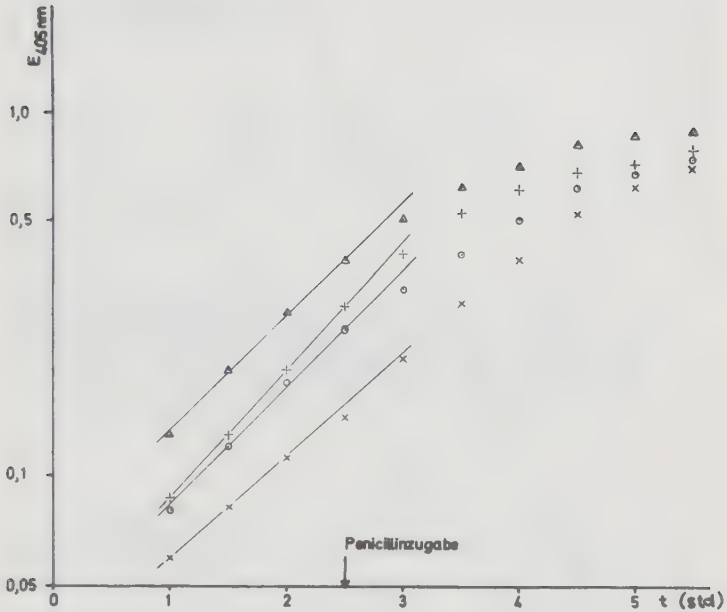


Abb. 14:

Wachstum von *E. coli* in Nährlösung [45] bei 37°C und einer Atmosphäre von 95 % O₂ / 5 % CO₂. E_{405 nm} von 0,2 entspricht etwa einer Zellzahl von 10⁸ Zellen pro ml. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden 0,1 [x], 1 [o] bzw. 10 [+] μg Penicillin pro ml Nährlösung zugesetzt [Δ = Kontrolle]. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß das Bakterienwachstum [Steigung der Geraden] nicht beeinflusst wurde. Die verschiedene Lage der Geraden ist nur durch den unterschiedlichen Zellgehalt der Suspension bedingt.

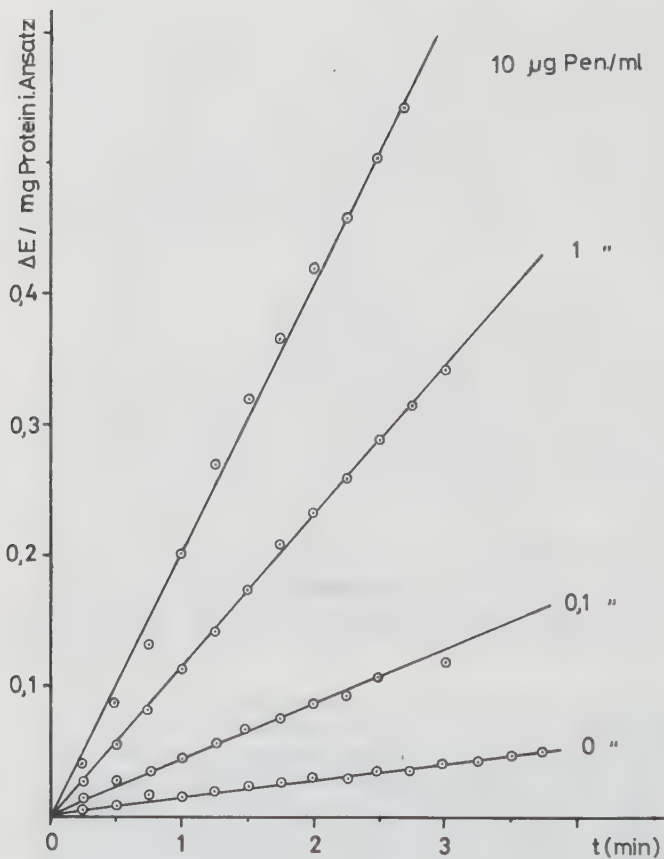


Abb. 15:

Penicillinaseaktivität im Ultraschallhomogenat von *E. coli* nach Induktion mit verschiedenen Penicillinkonzentrationen, bezogen auf mg Protein.

Ansatz: 10 ml 25 μM pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8, 30 μl Ultraschallhomogenat [Proteingehalt jeweils etwa 0,5 mg].

Start: 100 μl 20 mM Penicillinlösung.

Penicillin im Ansatz [$\mu\text{g}/\text{l}$]	$\Delta E/2,5 \text{ min}$	mU/ml	mg Protein/ml	mU/mg Protein
0	0,016	60,4	18,4	3,3
0,1	0,050	188,7	16,5	11,4
1	0,153	577,3	17,8	32,4
10	0,273	1030,0	18,0	57,2

Tab. 2:

Penicillinaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen im Ultraschallhomogenat von *E. coli* [nach Induktion mit verschiedenen Penicillinkonzentrationen]. Der Ansatz enthielt 30 μl Ultraschallhomogenat. Penicillinaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen wurden bezogen auf je 1 ml Ultraschallhomogenat.

II. pH - Stat - Methode

1. Prinzip der Methode

Bei der Spaltung von Penicillin durch Penicillinase entsteht eine neue Säuregruppe, die alkalimetrisch titriert werden kann [8]. Wise und Twigg [77] hatten sich bereits dieser Methode bedient und kinetische Messungen durchgeführt, indem sie durch Titrieren aus einer Bürette den pH-Wert konstant hielten. Citry und Zyk [20] benutzten die Methode im pH-Stat-Gerät, in dem die Titration automatisch erfolgt [35]. Dabei wird durch das Potential einer Glaselektrode die Zufuhr an Titrationsmittel so gesteuert, daß der pH konstant gehalten wird. Ein mechanischer Schreiber registriert dabei den zeitlichen Verlauf dieser Zugabe.

2. Wahl des pH - Wertes

Citry und Zyk [20] hatten bei pH 6,0 titriert. Bei Penicillinbestimmungen zeigte sich jedoch, daß die aus dem Verbrauch an Titrationsmittel errechnete Menge etwa 15 % unter der vorgegebenen lag. Citry und Zyk hatten wahrscheinlich einen pK-Wert für die entstehende Säuregruppe von 4,7 zugrunde gelegt, wie er mehrfach in der Literatur erwähnt wird [8, 56]. Wir überprüften diesen pK-Wert, indem wir eine pH-Titrationskurve von Natriumbenzylpenicilloat erstellten [Abb. 16], und fanden einen pK-Wert von 5,3, wie er auch von Mazingo [50] und Woodward [79] u.a. angegeben wird. Benedict u.a. [8], die als erste die entstehende Säuregruppe titrierten und 4,7 als pK-Wert angaben, machten keine genaueren Angaben über die Ausführung der Titration. Es wäre zu bedenken, ob es sich bei der titrierten Substanz nicht ganz oder teilweise um ein Dekarboxylierungsprodukt der Penicillosäure, nämlich Penillosäure, handelte [vgl. 79].

Aus dem pK-Wert 5,3 folgt jedoch, daß bei pH 6,0 nur 83,3 % titriert werden, wie aus der pH-Titrationskurve [Abb. 16] abgelesen werden kann. Wir titrieren deshalb bei einem pH-Wert von 6,8, bei dem 97 % der Säuregruppen erfaßt werden.

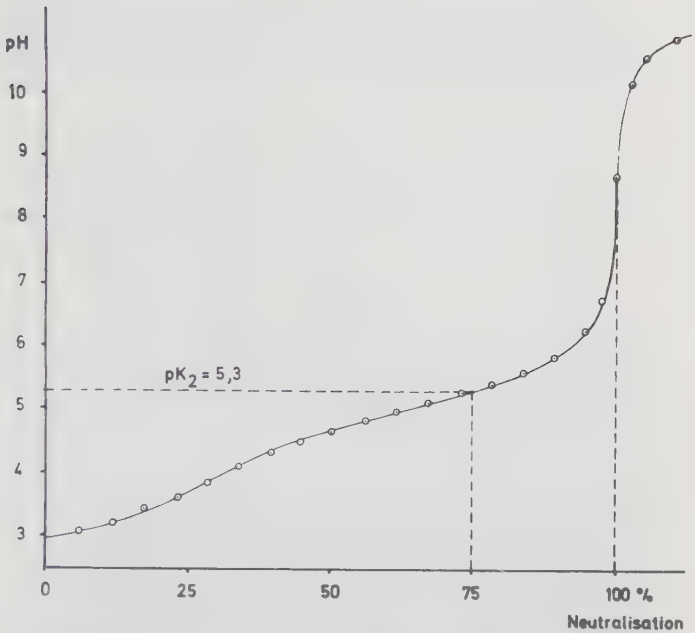


Abb. 16:

pH - Titrationskurve von 25 ml 0,25 mM Benzylpenicillat-Lösung in 0,1 M KCl-Lösung. 25°C, Titrationsmittel: 20 mN NaOH.

3. Aktivitätsbestimmung bei hohen Substratkonzentrationen - Einfluß von pCMB

Bei Substratkonzentrationen zwischen 2 und 100 mM führten wir vergleichende Aktivitätsbestimmungen mit und ohne pCMB-Zusatz durch. Die pCMB-Konzentration im Ansatz betrug 25 μ M. Die Ergebnisse [Tab.3] zeigen, daß keine signifikante Hemmung der enzymatischen Reaktion vorliegt. Die statistische Auswertung ergab vielmehr, daß bei der relativ großen Streuung der Meßwerte die Zufallswahrscheinlichkeit der Abweichung 60 % beträgt. [Student's $t = 0,54$, 12 Freiheitsgrade].

Penicillinkonzentration [mM]	Aktivität ohne Zusatz [$\mu\text{Mol/min}$]	Aktivität in 25 μM pCMB [$\mu\text{Mol/min}$]
2	0,70	0,85
10	0,80	0,87
20	0,90	1,00
20	0,90	0,78
25	0,74	0,72
50	1,00	0,88
100	0,98	0,70
$M \pm \varepsilon$	$0,826 \pm 0,05$	$0,823 \pm 0,03$

Tab. 3:

Titrimetrisch bestimmte Penicillinaseaktivitäten bei verschiedenen Penicillinkonzentrationen, mit und ohne pCMB-Zusatz. Die Substratsättigung des Enzyms beträgt schon bei der geringsten Penicillinkonzentration [2 mM] 98% [$k_M = 40 \mu\text{M}$]. Eine Erhöhung der Substratkonzentration hat daher keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

4. Messung bei kleinen Substratkonzentrationen

Der Konzentrationsbereich, in dem die Methode anwendbar ist, ist dadurch begrenzt, daß bei gut auswertbaren Messungen die Konzentration des Titrationsmittels nicht kleiner als 10 mN und der Verbrauch pro Minute mindestens 20 μl sein sollte, das bedeutet einen Substratumsatz von mindestens 0,2 μMol pro Minute. Da die Reaktion außerdem etwa 10 Minuten laufen muß, um gut auswertbare Kurven zu liefern, ist dadurch eine Mindestsubstratkonzentration von 200 μM bedingt, da im Reaktionsgefäß nur etwa 5 ml Ansatzlösung untergebracht werden kann.

Diese Schwierigkeit versuchten wir zu umgehen, indem

die Substratkonzentration durch adäquate Zufuhr während der Reaktion konstant gehalten wurde. Der Versuch, dem Titrationsmittel äquimolaren Mengen Penicillin zuzusetzen, scheiterte daran, daß Penicillin auch bei relativ schwach alkalischer Reaktion, z.B. in Boratlösung, rasch zersetzt wurde. Wir bauten daher eine Büretteneinheit [SBU la der Firma Radiometer Copenhagen] so um, daß Titrationsmittel und Substratlösung gleicher molarer Konzentration simultan aus zwei Kolbenbüretten mit gleicher Geschwindigkeit zugeführt wurde. [Abb. 17]. [vgl. 62].

Die Übereinstimmung der abgegebenen Volumina bei dieser simultanen Förderung wurde zunächst überprüft, indem beide Kolbenbüretten mit der gleichen 0,2 mM Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung gefüllt wurden. In zwei 4 cm - Glasküvetten wurden je 10 ml Kaliumthiocyanatlösung gegeben, und aus den Kolbenbüretten simultan in gleichmäßigen Schritten über Kapillarschläuche die Eisen-III-Lösung in je eine Küvette zugefügt. Nach Umrühren wurde die Extinktion des entstehenden Eisen-III-thiocyanatkomplexes bei 480 nm [Absorptionsmaximum] im Photometer Eppendorf bestimmt, und die bei gleichen Mengen zugefügter Eisen-III-Lösung abgelesenen Extinktionen der beiden Küvetten gegeneinander aufgetragen [Abb. 18]. Die erhaltenen Meßpunkte liegen auf einer Geraden mit der Steigung $\text{tg } \alpha = 1$, das bedeutet, daß aus beiden Bürettenspritzen über den gesamten Bereich gleiche Volumina abgegeben wurden.

Anschließend bestimmten wir mit dieser Methode die Reaktionsgeschwindigkeit der Penicillinspaltung durch Penicillinase bei Substratkonzentrationen zwischen 200 und 30 μM Penicillin. Die Zeit - Umsatz - Kurven sind in Abb. 19 wiedergegeben. Zur Auswertung wurden die geraden Anfangsteile verlängert, bzw. bei den kleinen Konzentrationen Tangenten angelegt. Die Auswertung im Lineweaver - Burk - Diagramm [Abb. 20] ergab eine Michaeliskonstante von 80 μM . Der Korrelationskoeffizient der berechneten Regressionsgeraden beträgt 0,981.

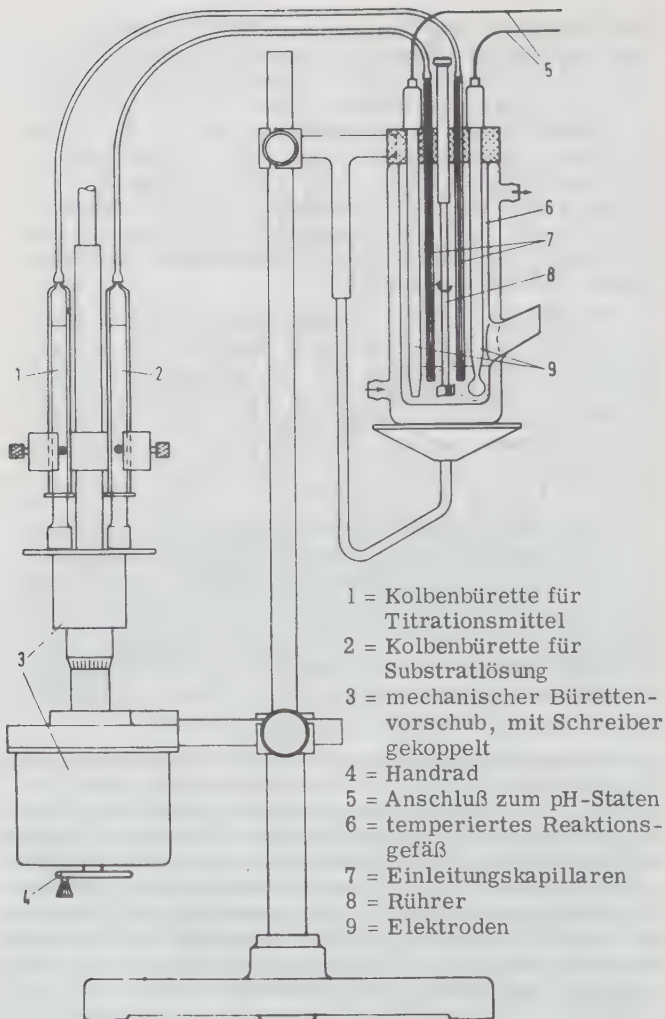


Abb. 17:

Büretteneinheit für den pH-Stat mit zwei Kolbenbüretten.

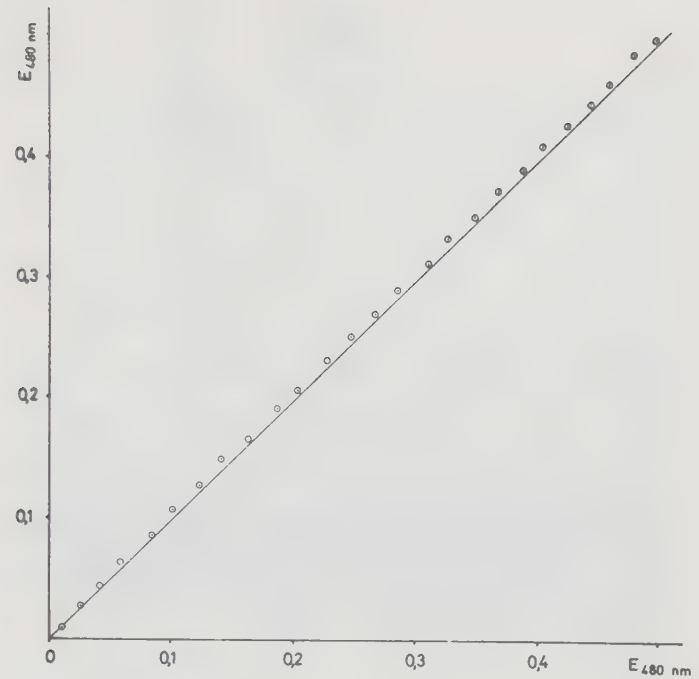


Abb. 18:

Prüfung der Übereinstimmung der beiden Kolbenbüretten des pH-Statens: aus beiden Büretten wurde dieselbe Fe-III-Lösung in gleichmäßigen Schritten in je eine mit KSCN-Lösung beschickte Küvette gegeben, und die Bildung des Eisenrhodanidkomplexes photometrisch verfolgt. Die für beide Küvetten erhaltenen Extinktionswerte sind gegeneinander aufgetragen. Die eingezeichnete Gerade entspricht der genauen simultanen Förderung gleicher Teilvolumina.

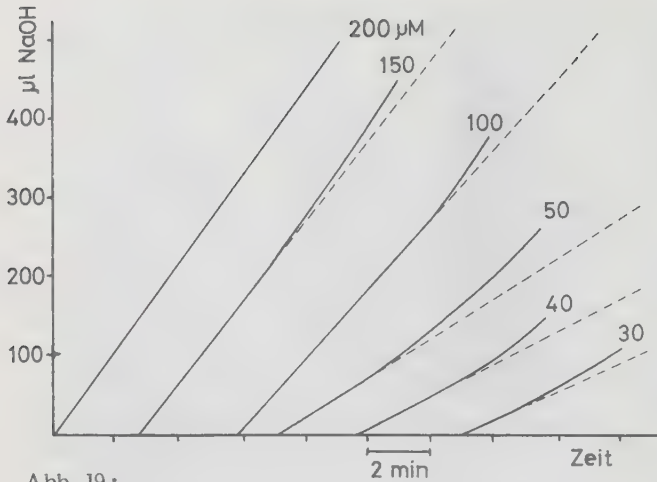


Abb. 19:

Titrimetrisch erhaltene Zeit - Umsatz - Kurven bei der Penicillinspaltung durch Penicillinase. Die Messung erfolgte bei verschiedenen Substratkonzentrationen [Zahlenangaben an den Kurven], die durch gesteuerte Substratzufuhr konstant gehalten wurden.

Pen. Lsg. [mg/ml]	[S] [mMol/l]	v [μ Mol/min]	1/v [min/ μ Mol]	1/[S] [l/mMol]
0,300	0,20	0,97	1,03	5
0,300	0,20	1,08	0,91	5
0,225	0,15	0,96	1,04	6,6
0,225	0,15	1,02	1,00	6,6
0,150	0,10	0,89	1,12	10
0,150	0,10	0,80	1,25	10
0,075	0,05	0,55	1,81	20
0,075	0,05	0,58	1,72	20
0,060	0,04	0,46	2,17	25
0,045	0,03	0,43	2,32	33

Tab. 4:

Ergebnisse der titrimetrischen Aktivitätsbestimmung

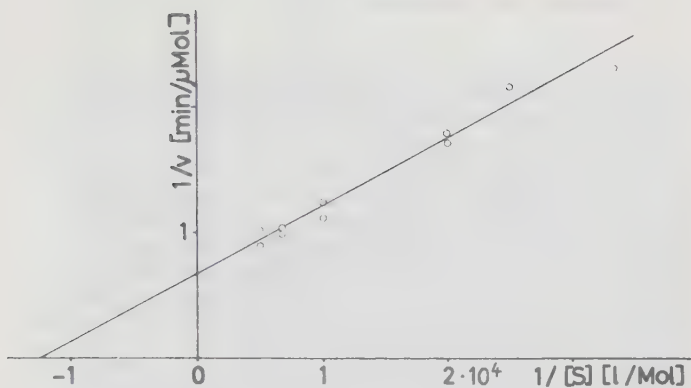


Abb. 20:

Lineweaver - Burk - Diagramm aus den titrimetrischen Aktivitätsbestimmungen von Abb. 19. Michaeliskonstante: $80 \mu\text{M}$. Regressionsgerade: $1/v \text{ [min}/\mu\text{Mol}] = 0.51 \cdot 10^4 \cdot 1/[S] \text{ [lit/Mol]} + 7.08$. Korrelationskoeffizient: 0.981.

III. Vergleich der Methoden

Die pH-Stat-Methode erfordert gegenüber der photometrischen einen erheblich größeren apparativen und arbeitsmäßigen Aufwand. Die Bürettenspritzen und Schläuche müssen sorgfältig mit der am Versuchstag bereiteten NaOH- bzw. Penicillinlösung durchgespült und blasenfrei gefüllt werden. Die Lösungen selbst müssen genau äquivalent sein und meist mehrmals gegeneinander titriert und entsprechend verdünnt werden. Die Einzelbestimmung nimmt außerdem noch etwa 15 Minuten in Anspruch. Eine photometrische Bestimmung dagegen ist in maximal 5 Minuten durchgeführt und erfordert keine besonderen Vorbereitungen.

Bei der titrimetrischen Methode ist ein Mindest-pH-Wert von 6,8 erforderlich [vgl. S.32]. Bei darunterliegenden Werten werden scheinbar geringere Aktivitäten gemessen. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches muß außerdem exakt mit der Endpunkteinstellung des pH-Statens übereinstimmen.

Außerdem sind bei der pH-Stat-Methode wesentlich mehr Fehlerquellen vorhanden, und die Methode führt zu ungenaueren Ergebnissen als die photometrische. Die größere Genauigkeit der photometrischen Methode drückt sich in der geringeren Streuung der Ergebnisse der Einzelbestimmungen aus: die für das Lineweaver-Burk-Diagramm berechnete Regressionsgerade hatte bei sechs eingesetzten Werten einen Korrelationskoeffizienten von 0,997, während sich bei der pH-Stat-Methode bei zehn Einzelwerten ein Korrelationskoeffizient von 0,981 ergab. So sind wohl auch die mit beiden Methoden erhaltenen unterschiedlichen k_M -Werte zu erklären: während wir titrimetrisch eine Michaeliskonstante von 80 μM ermittelten, fanden wir bei photometrischer Bestimmung einen Wert von 40 μM .

C | Zusammenfassung

Es wird die Entwicklung einer spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung von Penicillinase beschrieben:

1. Die bei der enzymatischen Reaktion entstehende Penicillosäure reagiert mit pCMB unter Spaltung des Thiazolidinringes über ein Zwischenprodukt zum Mercaptid des Penicillamins. Die Mercaptidbildung kann bei 250 nm photometrisch verfolgt werden.
2. Die Geschwindigkeit der Mercaptidbildung ist abhängig von der Ionenstärke der Lösung. Diese muß mindestens $I=0,2$ betragen, damit die Reaktion rasch genug abläuft und die enzymatische Spaltung in der Reaktionskette geschwindigkeitsbestimmend ist.
3. Im Bereich von pH 6,0 bis pH 6,8 hat eine Änderung des pH - Wertes keinen wesentlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Mercaptidbildung.
4. Das Lambert - Beersche Gesetz ist bis zu einem Penicilloatzusatz von etwa 10 nMol pro ml Ansatz erfüllt.
5. Die Enzymaktivität wird durch pCMB in den hier angewandten Konzentrationen nicht beeinflusst.
6. Das pH - Optimum von Penicillinase liegt zwischen pH 6,0 und pH 7,0. Bei einem Wert von 6,8 kann die Enzymaktivität sowohl spektrophotometrisch wie auch alkalimetrisch bestimmt werden.
7. Die Ionenstärke der Lösung hat im Bereich von $I=0,2$ bis $I=0,4$ keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.
8. Natrium - und Sulfationen beeinflussen das Enzym im untersuchten Konzentrationsbereich nicht. Dagegen tritt bei einem Gehalt der Lösung von 0,2 M Perchlorat eine 50 %ige Hemmung auf.
9. Die Methode wurde für folgende Aufgaben angewandt: Bestimmung der Michaeliskonstanten, Bestimmung der Penicillinaseaktivität im Kaninchenplasma nach i.v. -

Injektion, Bestimmung von Penicillinase im Ultraschall-homogenat von E.coli nach Induktion durch Penicillin.

10. Gegenüber der alkalimetrischen ist die photometrische Methode ungleich einfacher und rascher durchführbar, die Einzelmeßwerte zeigen geringere Streuung, und die erhaltenen Ergebnisse sind genauer.

D | Methodischer Teil

I. Geräte, Reagentien, Lösungen

1. Geräte

Extinktionsmessungen bei 480 nm erfolgten mit dem Photometer Eppendorf [Cd-Lampe, Filter Cd 480 nm], bei anderen Wellenlängen mit dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss. Absorptionsspektren wurden mit dem Spektralphotometer RPQ 20 A [Zeiss] aufgenommen.

Für die alkalimetrische Aktivitätsbestimmung benutzten wir das automatische Titriergerät der Firma Radiometer Copenhagen: Autotitrator TTT 1a, Titrigraph SBR 2c, Mikrobürette SBU 1a, und für die Bestimmung bei kleinen Substratkonzentrationen eine Vorrichtung mit zwei Kolbenbüretten, mit der Titrationsmittel und Substratlösung gleicher molarer Konzentration simultan zugeführt werden konnte [s.S. 35].

Die optische Drehung [Reinheitskontrolle des Penicillins] bestimmten wir mit dem lichtelektrischen Polarimeter 0,005⁰ [Zeiss].

Zur Messung des pH-Wertes benutzten wir die Glaselektrode Typ 205-NS und die gesättigte Kalomelelektrode Typ 303-NB [beide Firma Dr. Ingold, Frankfurt am Main], als Potentiometer das pH-Meter der Firma Knick, Berlin. Die Titration des Natriumbenzylpenicilloats wurde mit einem Mikrodosimeter [Firma Dr. Ingold, 1 Skalenteil = 1 μ l] durchgeführt.

Ausserdem benutzten wir den Lyophilisator GT 1,5 der Firma Leybold, Köln-Bayental, und den Ultraschall-dysintegrator der Firma MSE,

Statistische Auswertungen erfolgten mit dem elektronischen Rechensystem Diehl combitron S mit Diehl detector [Programme: Diehl Archiv Nr. 10 343 a und Nr. 10 328].

2. Reagentien

Die Penicillinase war ein Präparat der Riker Laboratories, Northridge, California, [Penicillinase injectable, Neutrapen], die nach Angaben des Herstellers aus *Bacillus cereus*-Kulturen gewonnen wurde. Eine Ampulle enthielt 800 000 Einheiten nach Levy [42], das entspricht 1340 Internationalen Einheiten x].

Benzylpenicillin-Natriumsalz für Testzwecke erhielten wir von der Firma Hoechst [1650 Einheiten / mg]

Benzylpenicillosäure-Natriumsalz wurde nach Schneider [64] folgendermaßen hergestellt:

Zu 6,7 g Penicillin-G-Na in 60 ml bidest. Wasser wurde aus einem Tropftrichter 540 ml 0,04 N NaOH mit einer Tropfgeschwindigkeit von 70 Tropfen pro Minute zugegeben. Nach Abkühlen auf 5°C wurde der pH zu 11,0 bestimmt. Durch Zugabe von 1 N HCl wurde ein pH von 5,0 eingestellt. Je 100 ml dieser Lösung wurden eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde über P_2O_5 im Exsikkator aufbewahrt, danach mit 18 ml bidest. Wasser aufgenommen, wobei nach Reiben der Gefäßwand mit einem Glasstab sich farblose Kristalle bildeten. Das Rohkristallisat wurde abgesaugt und aus etwa 50 ml heißem Alkohol-Wasser [4 + 1] umkristallisiert und erneut im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute 1,8 g.

p-Chlormercuribenzoessäure-Natriumsalz [rein] kauften wir von der Firma Serva, Heidelberg.

Folinreagens [24] war ein Präparat der Firma Merck.

Die übrigen Substanzen waren analysenreine Handelspräparate.

x] 1 Einheit nach Levy = die Menge Penicillinase, die bei 25°C u. pH 7 1 Einh. Penicillin pro Min. inaktiviert.

1 Internat. Einheit [U] = Enzymmenge, die bei 25°C u. pH-Optimum 1 μ Mol Substrat pro Min. umsetzt.

3. Lösungen

Penicillinaselösung: der Inhalt einer Ampulle Neutra-pen wurde in 2 ml bidest. Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt etwa 670 IU pro ml. Weitere Verdünnung erfolgte wie bei den entsprechenden Versuchen angegeben.

pCMB - Lösung, modifiziert nach Boyer [11]: p-Chlor-mercuribenzoat wird in 1 mM NaOH zu einer 1 mM Stammlösung gelöst. 5 ml [bzw. 10 und 15 ml, wenn höhere pCMB - Endkonzentrationen gebraucht werden] dieser Stammlösung werden jeweils am Versuchstag mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 auf 200 ml aufgefüllt.

Pufferlösungen:

0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 [nach Sörensen] wurde durch Mischen von 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung [13,608 g ad 1 lit. bidest. Wasser] und 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung [17,8 g ad 1 lit. bidest. Wasser] im Verhältnis 1:1 hergestellt. Genaue Einstellung des pH - Wertes erfolgte an der Glaselektrode durch Zusatz der entsprechenden Stammlösung. [59].

0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 wurde aus 50 ml 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung durch Zugabe von 5,6 ml 0,1 N NaOH unter pH - Kontrolle hergestellt, 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 nach derselben Vorschrift durch Zugabe von 11,6 ml 0,1 N NaOH. [60].

0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 wurde aus 0,5 N Essigsäure und 0,5 N NaOH im Verhältnis 2:1 unter pH - Kontrolle hergestellt. [59].

Cysteinlösung zur photometrischen Titration: etwa 8,8 mg Cystein wurden auf 0,01 mg genau gewogen und in 100 ml bidest. Wasser gelöst, das zuvor durch Durchleiten von gereinigtem Stickstoff von gelöstem Sauerstoff befreit worden war. Dadurch wurde eine spontane Oxidation der SH - Gruppen ausgeschlossen.

II. Gehaltsbestimmungen

1. Gehaltsbestimmung von Natriumbenzylpenicilloat durch photometrische Titration [38]

pCMB reagiert mit SH-Gruppen unter Mercaptidbildung [s.S.9], was photometrisch verfolgt werden kann. Eine Cysteinlösung bekannter Konzentration kann zur Titerstellung von pCMB-Lösung benutzt werden. Die unbekannte Menge einer Substanz, die SH-Gruppen enthält, die ebenfalls mit pCMB reagieren [z.B. Benzylpenicillösäure], kann ermittelt werden, indem man die Substanz mit einem gemessenen Überschuß von pCMB-Lösung reagieren läßt, und durch Rücktitration mit der Cysteinlösung den genauen Verbrauch ermittelt.

Mit 0,5 mM Cysteinlösung wurden 10 ml etwa 25 μ M pCMB-Lösung zu einer 4 cm Quarzküvette unter Verfolgung der Extinktionszunahme bei 250 nm in 50 μ l-Schritten titriert. Aus dem graphisch ermittelten Äquivalenzpunkt wurde der Verbrauch an Cystein in μ Mol berechnet. Die Titration wurde wiederholt, wobei 250 μ l einer 0,5 mM Natriumbenzylpenicilloatlösung vorgelegt wurden und anschließend mit Cystein bis zum Äquivalenzpunkt titriert wurde. Die Differenz des Cysteinverbrauches bei Titration 1 und 2 in nMol ergibt die Menge an Penicilloat. Der Vergleich mit der Einwaage ergab einen Gehalt von 97,8 %.

Rechengang:

Einwaage	18,739 mg	=	50,02 μ Mol
davon eingesetzt	1/400	=	<u>125,05 nMol</u>
Molarität der Cysteinlösung: 8,601 mg/100 ml = 0,49 mM			
Verbrauch bei Titration 1:	522,5 μ l	=	255,82 nMol
Verbrauch bei Titration 2:	272,5 μ l	=	<u>133,42 nMol</u>
gefundene Menge Na - Benzylpenicilloat			<u>122,40 nMol</u>
	entspricht		97,8 %

2. Gehaltsbestimmung von Penicillin

a] durch photometrische Titration [s.o.]

Die Penicillineinwaage wurde in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 gelöst und mit 50 μ l unverdünnter Penicillinaselösung versetzt. Die Lösung blieb 30 Minuten stehen, danach wurden 250 μ l in eine 4 cm Quarzküvette zu 10 ml einer etwa 25 μ M pCMB-Lösung in 0,33 M Acetatpuffer pH 4,6 gegeben. Das nicht zur Mercaptidbildung verbrauchte pCMB wurde mit 0,5 mM Cysteinlösung wie unter 1.] beschrieben titriert, nachdem zuvor die genaue Konzentration der pCMB-Lösung durch Titration mit der Cysteinlösung ermittelt worden war. Eine Doppelbestimmung ergab im Mittel 96,3 % der Einwaage.

Rechengang:

Einwaage	18,194	51,05 μ Mol
davon eingesetzt 1/400		<u>1 27,62 nMol</u>
Molarität d. Cysteinlösung:	8,902 mg/100 ml = 0,507 mM	
Verbrauch bei Titration 1:	465,0 μ l =	235,68 nMol
Verbrauch bei Titration 2:	222,5 μ l =	<u>112,77 nMol</u>
gefundene Menge Benzylpenicillin:		<u>122,91 nMol</u>
	entspricht	96,3 %

b] Gehaltsbestimmung aus der optischen Drehung

50 mg Penicillin wurden in 10 ml bidest. Wasser gelöst, und der Drehwinkel dieser Lösung bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. α_{546} x] betrug 1,755° und α_{578} 1,525°. Nach der Drudeschen Gleichung wurde α_D berechnet

$$\alpha_D = \alpha_{589} = \frac{\frac{\alpha_{546}}{\alpha_{578} - \alpha_{546}} \cdot 0,7285 \cdot \alpha_1}{\frac{\alpha_{546}}{\alpha_{578} - \alpha_{546}} \cdot 0,7285 + 1}$$

x] Die Indices bedeuten die Wellenlänge, bei der die Drehwinkel gemessen wurden.

und die Konzentration der Lösung nach der Formel $\alpha_{589} = [\alpha]_{589} \cdot c \cdot d$ [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot 10$] bestimmt. $[\alpha]_{589}$ ist die spezifische Drehung für Penicillin-G-Natrium-salz: $[\alpha]_{589} = +298$ [13]. Die Bestimmung ergab einen Gehalt von 98,4 %.

III. Photometrische Bestimmungen

Die Absorptionsmessungen wurden mit einer Meßstrahlung der Wellenlänge 250 nm durchgeführt.

1. Photometrische Bestimmung der Penicillinaseaktivität

a] in Lösungen des Enzyms und im Kaninchenplasma

Reaktionsansatz	Vergleichsansatz
10 ml 25 μM pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8	10 ml 25 μM pCMB in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8
50 μl Enzymlösung verdünnt 1:1000 mit Puffer [5-25 mU]	
Start: 100 μl 20 mM Penicillin-G-Na [178,2 mg/25 ml H_2O], bzw. zur Bestimmung der Michaeliskonstanten je- weils 100 μl der entsprechenden Verdünnungen [5 : 10, 4 : 10, 3 : 10, 2 : 10, 1 : 10].	

Die Extinktion bei 250 nm wurde alle 15 Sekunden abgelesen. Für die Messung im Kaninchenplasma wurde wegen der hohen UV-Absorption der Serumproteine je 100 μl Plasma in beide Küvetten pipettiert, um eine entsprechende Nullpunktverschiebung zu erreichen.

Unter sonst gleichen Bedingungen wurde die Aktivitätsbestimmung auch in 50 μM und 75 μM pCMB-Lösung durchgeführt.

Die Messungen bei höherer Ionenstärke [$I=0,4$] erfolgten nach Zugabe von 2 mMol KClO_4 bzw. 1 mMol Na_2SO_4 in die Küvette.

b] im Ultraschallhomogenat von *Escherichia coli*

Je 30 μl eines Ultraschallhomogenates von *E. coli* B 163 [45], in denen Penicillinase induziert worden war, wurden zur Bestimmung [s. a] in beide Küvetten eingesetzt. Die gemessenen Aktivitäten wurden bezogen auf

die Proteinkonzentration im Homogenat, die wir nach Lowry [44] bestimmten [s.u.]. Es zeigte sich, daß sie nicht mehr als 20 mg pro ml betragen durfte. Die Probe soll zwischen 5 und 25 mU [internationale Einheiten] Penicillinase enthalten, gegebenenfalls mußte verdünnt werden. Die Messung erfolgte bei maximaler Empfindlichkeit des Anzeigegerätes, um die Spaltbreite des Monochromators möglichst klein zu halten.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry [44]

Die Methode beruht auf der Reduktionswirkung der Tryptophan- und Tyrosinreste des Proteins auf die im Reagens enthaltenen Phosphowolframate bzw. Phosphomolybdate.

50 bzw. 100 μ l Ultraschallhomogenat wurden jeweils zur Bestimmung eingesetzt, und das enthaltene Protein mit etwa 5 ml 10 %iger Trichloressigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit 5 ml 1 N NaOH aufgenommen und bei 60°C 30 Minuten inkubiert. 0,2 ml dieser Lösung wurden mit 2,0 ml einer Mischung aus 2 %iger Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 N NaOH und 0,5 %iger $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung in 1 %igem Na-K-Tartrat im Verhältnis 50 : 1 versetzt. Nach 10 Minuten Stehen bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Folinreagens zugegeben, und nach weiteren 30 Minuten wurde die Extinktion bei 578 nm im Photometer Eppendorf gemessen. Die Eichung erfolgte gegen verdünntes menschliches Serum, dabei ergab ein Gehalt von 20 γ Protein in der Probe [0,2 ml der NaOH-Lösung] eine Extinktion von 0,110.

Folinreagens der Firma Merck wurde mit 1 N NaOH bis zum Umschlagspunkt von Phenolphthalein titriert und so verdünnt, daß eine 1 N Säure erhalten wurde [24].

2. Untersuchung der Mercaptidbildung aus Natriumbenzylpenicilloat und pCMB

In die Reaktions- und die Vergleichsküvette wurden je 10 ml einer 25 μ M pCMB-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ l 0,5 mM Natriumbenzylpenicilloatlösung gestartet [17,82 mg ad 100 ml H_2O], und die Extinktion alle 15 Sekunden abgelesen.

Die Messungen wurden nach Veränderung der Pufferkonzentration [0,1 M, 0,01 M, 0,001 M] und des pH-Wertes [pH 6,8, pH 4,6, pH 6,0], außerdem nach Veränderung der Ionenstärke des 0,1 M Phosphatpuffers pH 6,8 durch Zugabe von 2 mMol KClO_4 bzw. 1 mMol Na_2SO_4 direkt in die Küvette wiederholt.

3. Absorptionsspektren zwischen 290 und 240 nm

Ansatz: 10 ml 25 μM pCMB gelöst in
a) 0,001 M Na - Phosphat pH 6,8
b) 0,1 M Na - Phosphat pH 6,8
c) 0,1 M Na - Phosphat pH 6,0

Jeweils 3 ml dieses Ansatzes wurden in zwei 1 cm Quarzküvetten pipettiert. Durch Zugabe von 50 μl Natriumbenzylpenicilloat in die Reaktionsküvette wurde die Reaktion gestartet, und sofort danach, sowie zu den in den Kurven angegebenen Zeiten [Abb.4], wurden die Spektren, gemessen gegen die Ansatzlösung in der Vergleichsküvette, mit dem Spektralphotometer M4 Q III [Zeiss] geschrieben [Laufzeit eines Spektrums etwa 3 Minuten].

4. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten - Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes

37,4 mg Natriumbenzylpenicilloat wurden zunächst mit bidest. Wasser zu 100 ml aufgefüllt. Aus dieser 1 mM Lösung wurden folgende Verdünnungsstufen hergestellt: 1 : 10, 1,5 : 10, 2 : 10, 2,5 : 10, 3 : 10, 3,5 : 10, 4 : 10, 5 : 10, 6 : 10, 7 : 10, 8 : 10, 9 : 10, 10 : 10. Die Einzelmessungen erfolgten jeweils nach Zugabe von 250 μl dieser Lösungen zu 10 ml 25 μM pCMB-Lösung in 0,1M Phosphatpuffer pH 6,8 gegen pCMB-Pufferlösung gleicher Konzentration. Die Extinktion wurde abgelesen, nachdem sich ein konstanter Endwert eingestellt hatte [nach etwa 1 bis 2 Minuten], und in Abhängigkeit von der in die Küvette gegebenen Penicilloatmenge [in μMol] aufgetragen [Abb.8]. Anhand der ersten sieben Meßpunkte [bis zur Verdünnungsstufe 4 : 10, das bedeutet einen Penicilloatzusatz von etwa 10 nMol pro ml Ansatz] wurde die Gleichung der Regressionsgeraden mit dem elektronischen Rechensystem Diehl combitron S mit Diehl detector [Programm: Diehl Archiv Nr. 10343a] bestimmt:

$E = 0,03577 \text{ nMol/ml} - 0,00733$. Da die Schichtdicke 4 cm betrug, ergibt sich daraus ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 8,94 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

IV. pH-Stat- Bestimmungen

1. Aktivitätsbestimmungen bei hohen Substratkonzentrationen

Die Messungen wurden in einem auf 25°C temperierten, doppelwandigen Reaktionsgefäß durchgeführt.

Ansatz ohne pCMB	Ansatz mit pCMB
2,1 ml 10 mN Phosphatpuffer pH 6,0 x]	2,0 ml 10 mN Phosphatpuffer pH 6,0
1,0 ml 0,5 %ige Gelatine-lösung im gleichen Puffer	1,0 ml 0,5 %ige Gelatine-lösung im gleichen Puffer
100 µl Penicillinaselösung [etwa 7 U/ ml]	100 µl Penicillinaselösung [etwa 7 U/ ml]
	100 µl 1 mM pCMB-Lösung

Der pH-Stat wurde bei stehendem Vorschub so eingestellt, daß die pH-Anzeige des Geräts mit dem pH-Wert der Lösung übereinstimmte. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Penicillinlösung [150 mg pro ml, bzw. 1:2, 1:4, 1:5, 1:10 und 1:50 verdünnte Lösungen] durch den seitlichen Einfüllstutzen gestartet. Der Schreiber registrierte dann die zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes notwendige Laugenzugabe. Titrationmittel: 20 mN NaOH.

x] Die Bestimmungen wurden in Anlehnung an Citry [20] bei pH 6,0 durchgeführt. Da es in diesem Zusammenhang nicht um quantitative Aktivitätsbestimmungen, sondern um den pCMB-Einfluß ging, wurden die Messungen nicht bei pH 6,8 wiederholt.

2. Bestimmung der Michaeliskonstanten

Das auf 25°C temperierte Reaktionsgefäß wurde mit 2,0 ml 1mM Phosphatpuffer pH 6,8, 1,0 ml 0,5%iger Gelatinelösung im gleichen Phosphatpuffer und 200 µl der 1:100 mit Puffer verdünnten Penicillinaselösung [etwa 7 U/ml] beschickt. Nach Einstellen des pH-Stats auf den genauen pH-Wert der Lösung wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Penicillinlösung gestartet.

Titrationmittel [1. Kolbenbürette]: 20 mN NaOH

Substratlösung [2. Kolbenbürette]: 20 mM Penicillinlösung. Die Lösung wurde zunächst etwas konzentrierter angesetzt [200 mg Penicillin in 20 ml 1mM Phosphatpuffer pH 6,8]. 0,5 ml dieser Lösung wurden [durch Betätigung des Handrades] zu 10 ml 1mM Phosphatpuffer pH 6,8 gegeben. Durch Zusatz von 20 µl unverdünnter Penicillinaselösung [670 U/ml] wurde das Penicillin zu Penicillosäure hydrolysiert, und diese mit 20 mN NaOH aus der 1. Kolbenbürette des pH-Statens wieder auf pH 6,8 titriert. Die Konzentration der Penicillinlösung wurde dann durch Verdünnen dem Titer der 20 mN NaOH angeglichen.

Die Konzentrationen der zugesetzten Penicillinlösungen, sowie die sich daraus ergebenden Substratkonzentrationen im Ansatz und die zugehörigen Aktivitätswerte sind in Tab.4 zusammengestellt.

V. Titration von Natriumbenzylpenicilloat - Bestimmung des pK - Wertes

Vorgelegt wurden 25 ml 0,25 mM Natriumbenzylpenicilloatlösung in 0,1M KCl [Ionenstärke $I=0,1$]. Die Titration erfolgte bei 25°C an der Glaselektrode unter Zugabe von 0,02 N NaOH in 10 µl-Schritten aus einem Mikrodosimeter. Nach jeder Zugabe wurde gemischt und der pH-Wert am pH-Meter abgelesen. Die erhaltene Titrationskurve ist in Abb. 16 dargestellt. Der aus dem pH-Sprung ermittelte Äquivalenzpunkt der 2. Säurestufe erlaubte die graphische Ermittlung des Äquivalenzpunktes der ersten Stufe und des pK-Wertes der

2. Stufe. Da die 1. und 2. Stufe jedoch nicht durch einen scharfen pH-Sprung voneinander abgegrenzt sind, erhält man auf diese Weise nur angenäherte pK-Werte. Diese Werte erlauben aber eine hinreichend genaue Angabe des titrierbaren Prozentsatzes bei pH 6,0 bzw. pH 6,8.

E] Literaturverzeichnis

1. ABRAHAM, E.P., "Penicillinase" in The Enzymes,
1. ed., 1, Ch.37, 1170. Hrsg.: J.B.Sumner
und K.Myrbäck, Academic Press Inc., New
Yorck 1951
2. ABRAHAM, E.P., E.CHAIN, Nature 146, 837, [1943]
An Enzyme from Bacteria Able to Destroy
Penicillin
3. AMBLER, R.P., R.J.MEADWAY, Nature 222, 24,
[1969]
Chemical Structure of Bacterial Penicilli-
nase
4. BANFIELD, J.E., Experientia 13, 403, [1957]
Kinetics of Penicillinase Activity
5. BATCHELOR, F.R., J.M.DEWDNEY, Proc.Roy.Soc.
Med. 61, 897, [1968]
Some Aspects of Penicillin Allergy
6. BECKER, R.M., New Engl.J.Med. 254, 952, [1956]
Effect of Penicillinase on Circulating Peni-
cillin
7. BECKER, R.M., Ann.Int.Med. 48, 1228, [1958]
A New Concept in the Treatment of Peni-
cillin Reactions: Use of Penicillinase
8. BENEDICT, R.G., W.H.SCHMIDT, R.D.COCHILL,
Arch.Biochem.Biophysics 8, 377, [1945]
Penicillin, VII. Penicillinase
9. BENESCH, R., R.E.BENESCH, Meth.biochem.Anal.
10, 43, [1962]
Determination of SH - Groups in Proteins
10. BONDI, A.J., C.C.DIETZ, Proc.Soc.Exp.Biol. 56,
135, [1944]
Relationship of Penicillinase to the Action
of Penicillin

11. BOYER, P.D., J.Amer.Chem.Soc. 76, 4331, [1954]
Spectrophotometric Study of the Reaction
of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials
12. BRODERSEN, R., Acta path.microbiol.scand. 24, 383
[1947]
zitiert nach Antibiotics 2, Kap.33, Hrsg.: H.
W.Florey, E.Chain, N.G.Heatley, M.A.
Jennings, A.G.Sanders, E.P.Abraham, M.
E.Florey, Oxford Univ. Press, London 1949
13. BRUNNER, R., G.MACHEK. [Hrsg.] in Die Antibio-
tica, Bd. 1, 1. Teil, Nürnberg 1962
14. CARLETON, J., M.HAMBURGER, J.Amer.Med.Ass.
186, 157, [1963]
Unmasking of False - Negative Blood Cultu-
res in Patients Receiving New Penicillins
15. CHEN, J.Y., J.W.BARD, A.A.BELSITO, Antibiot.
Ann.1957 - 58, p. 321
In Vivo Penicillin Inactivating Effect and
Toxicity of Penicillinase
16. CITRY, N., Biochem.biophys.Acta 27, 277, [1958]
Two Antigenically Different States of Acti-
ve Penicillinase
17. CITRY, N., Meth.Med.Res. 10, 221, [1964]
Determination of Penicillinase Activity
18. CITRY, N., N.GARBER, M.SELA, J.Biol.Chem. 235,
3454, [1960]
The Effect of Urea and Guanidine Hydro-
chloride on Activity and Optical Rotation of
Penicillinase
19. CITRY, N., M.R.POLLOCK, Advanc.Enzymol. 28,
273, [1966]
The Biochemistry and Function of β -Lac-
tamase [Penicillinase]

20. CITRY, N., N.ZYK, Biochem.biophys.Acta 99, 427,
[1965]
The Interaction of Penicillinase with Penicillins IV. Structural Aspects of Catalytic and Non-catalytic Interactions
21. DUTHIE, E.S., Brit.J.Exp.Path. 25, 96, [1944]
The Production of Penicillinase by Organisms of the Bacillus Subtilis Group
22. FEHER, E., M.GOZONY, Allergie und Asthma 7, 42,
[1961]
Erfahrungen mit der Penicillinasebehandlung der Penicillinallergie
23. FLOREY, H.W., E.CHAIN, N.G.HEATLEY, M.A.
JENNINGS, A.G.SANDERS, E.P.ABRAHAM,
M.E.FLOREY, Antibiotics 2, Kap.33,
Oxford Univ. Press. London 1949
24. FOLIN, O., V.CEOCALTEU, J.Biol.Chem. 73, 627,
[1927]
On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins
25. FOSTER, J.W., Science 101, 205, [1945]
Acid Formation from Penicillin During Enzymatic Inactivation
26. HAMILTON - MILLER, J.M.T., Biochem.biophys.Res.
Comm. 13, 43, [1963]
Inducible Penicillinase in Proteus Morgani
27. HAMILTON - MILLER, J.M.T., Bacteriol.Rev. 30,
761, [1966]
Penicillinacylase
28. HAMILTON - MILLER, J.M.T., J.T.SMITH, R.KNOX,
J.Pharm.Pharmakol. 15, 81, [1963]
The Estimation of Penicillins and Penicillin Destruction

29. HARPER, G.J., *Lancet* **II**, 569, [1943]
Inhibition of Penicillin in Routine Culture Media
30. HENRY, R.J., R.D.HOUSEWRIGHT, *J.Biol.Chem.* **167**, 559, [1947]
Studies on Penicillinase
II. Manometric Method of Assaying Penicillinase and Penicillin, Kinetics of the Penicillin - Penicillinase Reaction, and the Effects of Inhibitors on Penicillinase
31. HOUSEWRIGHT, R.D., R.J.HENRY, *J.Biol.Chem.* **167**, 553, [1947]
Studies on Penicillinase
I. The Production, Partial Purification and Practical Application of Penicillinase
32. HOUSEWRIGHT, R.D., R.J.HENRY, *J.Bacteriol.* **53**, 241, [1947]
Studies on Penicillinase
III. The Effect of Antipenicillinase on Penicillin - Resistant Organisms
33. IMSANDE, J., *J.Bacteriol.* **101**, 173, [1969]
Regulation of Penicillinase Synthesis: Evidence for a Unified Model
34. IMSANDE, J., F.D.GILLIN, R.J.TANIS, A.G. ATHERLY, *J.Biol.Chem.* **245**, 2205, [1970]
Properties of Penicillinase from *Bacillus cereus* 569
35. JACOBSEN, C.F., J.LEONIS, K.LINDERSTRØM, - LANG, M.OTTESEN, *Meth.biochem.Anal.* **4**, 171, [1957]
The pH-Stat and Its Use in Biochemistry
36. KIRBY, W.M.M., *Science* **99**, 452, [1944]
Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant *Staphylococci*

37. KIRBY, W.M.M., J.Clin.Invest. 24, 170, [1945]
Properties of a Penicillin Inactivator Ex-
tracted from Penicillin Resistant Staphy-
lococci
38. KOERBER, F., D.MODERSOHN, P.SIEGMUND, Z.
klin.Chem.klin.Biochem. 6, 289, [1968]
Über die photometrische Titration von
Thiazolidinen mit p-Mercuribenzoat und
die Anwendung zur enzymatisch - photome-
trischen Penicillinbestimmung
39. KRAUSHAAR, A.A., Schw.Med.Wschr. 98, 617, [1968]
Zum Problem der Penicillinresistenz
40. LE PAGE, G.A., J.F.MORGAN, M.E.CAMPBELL,
J. Biol.Chem. 166, 465, [1946]
Production and Purification of Penicillinase
41. LEVINE, B.B., J.Exptl.Med. 117, 161, [1963]
Studies on the Dimensions of the Rabbit
Anti - Benzylpenicilloyl Antibody Combin-
ing Sites
42. LEVY, G.B., Nature 166, 740, [1958]
A Unit of Penicillinase
43. LINEWEAVER, H., D.BURK, J.Amer.Chem.Soc. 56,
658, [1934]
Determination of Enzyme Dissociation Con-
stants
44. LOWRY, O.H., A.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR, R.J.
RANDALL, J.Biol.Chem. 193, 265, [1951]
Protein Measurement with the Folin Phen-
ol Reagent
45. LUBIN, M., B.KESSEL, Biochem.biophys.Res.Comm.
2, 249, [1960]
Preliminary Mapping of the Genetic Locus
for Potassium Transport in Escherichia coli
46. MARKOV, W., Z.Immunitätsforschung 113, 253, [1956]
Das Antipenicillinaseserum und die unitäre
Auffassung der Antikörperwirkung in vitro

47. MC QUARRIE, E.B., A.J. LIEBMANN, Arch. Biochem.
5, 307, [1944]
Studies on Penicillinase
48. MICHAELIS, L., M.L. MENTEN, Biochem. Z. 49, 333,
[1913]
Die Kinetik der Invertinwirkung
49. MINNO, A.M., G.M. DAVIS, J. Amer. Med. Ass. 165,
222, [1957]
Penicillinase in the Treatment of Penicillin
Reactions
50. MOZINGO, R., K. FOLKERS, "The Penicilloic and
Penilloic Acids and their Derivatives and
Analogues" in The Chemistry of Penicillin
S. 535, Hrsg.: H.T. Clarke, J.R. Johnson,
Sir R. Robinson, Princeton University Press,
Princeton N.J., 1949
51. MURTAUGH, J.J., G.B. LEVY, J. Amer. Chem. Soc.
67, 1042, [1945]
Chemical Method for the Determination of
Penicillin
52. NOVICK, R.P., Biochem. J. 83, 236, [1962]
Micro - Jodometric Assay for Penicillinase
53. PERRET, C.J., Nature 174, 1012, [1954]
Jodometric Assay of Penicillinase
54. POLLOCK, M.R., Brit. J. Exptl. Path. 31, 739, [1950]
Penicillinase Adaption in B. cereus: Adap-
tive Enzyme Formation in the Absence of
Free Substrate
55. POLLOCK, M.R., J. gen. Microbiol. 15, 154, [1956]
The Cell-bound Penicillinase of Bacillus
cereus
56. POLLOCK, M.R., "Penicillinase" in The Enzymes
4, 269, [1960] Hrsg.: P.D. Boyer, H. Lar-
dy u. K. Myrbäck, Academic Press, New
York - London, 1960

57. PROTIVINSKY, R., Hippokr. 18, 742, [1967]
Kausale Therapie der Penicillin - Allergie
mit Penicillinase
58. RAMMELKAMP, C.H., Proc.Soc.Exp.Biol. 51, 95,
[1942]
A Method for Determining the Concentra-
tion of Penicillin in Body Fluids and Exu-
dates
59. RAUEN, H.M., [Hrsg.], Biochem.Taschenbuch, S.
Springer - Verlag, Berlin, Göttingen, Hei-
delberg, 1964
60. ROBINSON, R.A., R.A.STOKES, in Electrolyte So-
lutions, London, New Yorck 1959
61. ROSSMANN, I., F.KOERBER, P.SIEGMUND. Z.klin.
Chem.klin.Biochem. 8, 269, [1970]
Eine Vorrichtung zur Konstanthaltung klei-
ner Substratkonzentrationen bei kinetischen
Messungen mit dem pH - Stat
62. ROSSMANN, I., P.SIEGMUND, F.KOERBER, Z.Anal.
Chem. 252, 199, [1970]
Spektrophotometrische Methode zur Bestim-
mung von Penicillinase
63. SABATH, L.D., M.JAGO, E.P.ABRAHAM, Biochem.J.
96, 739, [1965]
Cephalosporinase and Penicillinase Activities
of a β -Lactamase from Pseudomonas pyo-
cyanea
64. SCHNEIDER, C.H., A.L.DE WECK, Helv.Chim.Acta
50, 2011, [1967]
Zur Kenntnis der Benzylpenicilloinsäure
65. SCHNEIDER, C.H., A.L.DE WECK, Int.Arch.Allerg.
36, 140, [1969]
Immunochemical Aspects of Penicillin Che-
mistry

66. SCHWARTZ, M.A., J.Pharm.Sci. 58, 643, [1969]
Chemical Aspects of Penicillin Allergy
67. SIEGEL, B.B., B.B.LEVINE, J.Allerg. 35, 488,
[1964]
Antigenic Specificities of Skin Sensitizing
Antibodies in Sera from Patients with Im-
mediate Systemic Allergic Reactions to Pe-
nicillin
68. SIEGMUND, P., F.KOERBER, Clin.Chem. 14, 808,
[1968]
The Determination of Penicillin by a Spec-
trophotometric Titration with p-Mercuri-
benzoate after Cleavage with Penicillinase
69. SMITH, J.T., J.M.T.HAMILTON - MILLER, R.KNOX
J.Pharm.Pharmakol. 21, 337, [1969]
Bacterial Resistance to Penicillins and Ce-
phalosporins
70. STRASSMANN, H., Hautarzt 20, 323, [1969]
Studies on Patients with Penicillin - Allergy
with a Review of Literature
71. SUZUKI, S., A.SUGANUMA, T.OTANI, Antimicrob.Ag.
Chemoth. 4, 329, [1964]
Localization of Staphylococcal Penicillinase
72. SWEENEY, H.M., S.COHEN, J.Bacteriol. 96, 920,
[1968]
Wild-Type Strain of Staphylococcus aureus
Containing two Genetic Linkage Groups for
Penicillinase Production
73. "Treatment with Penicillinase", Brit.Med.J. 2, 294,
[1958]
74. UNGAR, J., Nature 154, 236, [1944]
Penicillinase from B. subtilis
75. WEINSTEIN, L., "The Penicillins" in The Pharma-
cological Basis of Therapeutics, 4. ed.,
p.1204. Hrsg.: L.S.Goodman u.A.Gilman,
The Macmillan Company, London, Toronto
1970

76. WESTERMANN, G., P. MA, R. DYKYJ, D. WINSTIN,
J. H. NODINE, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 4,
321, [1964]
Human in Vivo Kinetics of Penicillinase Ac-
tivity Against Penicillin G, Methicillin, and
Nafcillin
77. WISE, W. S., G. H. TWIGG, *Analyst* 75, 106, [1950]
The Determination of Penicillinase Activity
78. WOODRUFF, H. B., J. W. FOSTER, *J. Bacteriol.* 47,
425, [1944]
Bacterial Penicillinase
79. WOODWARD, R. B., A. NEUBERGER, N. R. TRENNER,
"Other Physical Methods" in *The Chemistry*
of Penicillin, S. 415, Hrsg.: H. T. Clarke, J. R.
Johnson, Sir R. Robinson, Princeton Universi-
ty Press, Princeton, N. J., 1949
80. YAMAGASHI, S., K. O. HARA, T. SAWAI, S. MITSUHA-
SHI, *J. Biochem.* 66, 11, [1969]
The Purification and Properties of Penicil-
lin β -Lactamases Mediated by Transmissi-
ble R-Factors in *Escherichia coli*
81. ZIMMERMANN, M. C., *Clin. Med.* 5, 305, [1958]
The Prophylaxis and Treatment of Penicil-
lin Reactions with Penicillinase
82. ZYK, N., N. CITRY, *Biochem. biophys. Acta* 159, 317,
[1967]
The Interaction of Penicillinase with Peni-
cillins VI. Comparison of Free and Anti-
body-bound Enzyme

Lebenslauf

Am 26.4.1946 wurde ich, Irene Jend-Rossmann, in Tübingen als Tochter des damaligen Landesdirektors des Innern, Lothar Rossmann, und seiner Ehefrau Lidwina Rossmann geb. Wolf geboren.

Meine Schulausbildung erhielt ich in Stuttgart. Dort legte ich am humanistischen Zweig des Hölderlin-Gymnasiums im Februar 1965 die Reifeprüfung ab.

Im Mai 1965 begann ich mit dem Medizinstudium, das an der Freien Universität Berlin und der Universität Wien erfolgte und mit dem Staatsexamen im Februar 1971 in Berlin abgeschlossen wurde.

Danach arbeitete ich 3 1/2 Monate als Medizinalassistentin im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin. Seit dem 1.8.1971 bin ich als Medizinalassistentin in der Medizinischen Klinik des Klinikums Westend in Berlin tätig.

